



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**“INTERRELACIONES DE LA SUSTANCIA GRIS
PERIACUEDUCTAL DORSOLATERAL Y LA REGIÓN
PROTUBERANCIAL A5 EN EL CONTROL CENTRAL
CARDIORRESPIRATORIO.”**

Doctorando: Carlos A. Peinado Aragonés

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

Málaga, Enero de 2016

AUTOR: Carlos Antonio Peinado Aragonés

 <http://orcid.org/0000-0001-7385-4777>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

***A MI HERMANO,
A MIS PADRES,
A MI MUJER,
A MI HIJA.***

*“Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Más no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca.”*

Viaje a Ítaca

Konstantinos Petrou Kavafis (1863-1933). Poeta griego.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profunda gratitud a todas aquellas personas que a lo largo de todo este tiempo han aportado su granito de arena en la realización de esta tesis doctoral, con especial atención:

Al Dr. D. Manuel Víctor López González, por su tiempo, por su esfuerzo, por su calidad como persona y la facilidad, naturalidad y sencillez con la que comparte su experiencia y conocimientos.

Al Prof. Dr. D. Marc Stefan Dawid-Milner, mi sentido agradecimiento como director de este proyecto. Por inculcarme los valores científicos como investigador y orientarme en cada uno de los pasos que han llevado a la elaboración de esta tesis. Sus destacadas cualidades científicas, docentes y, sobre todo, humanas, especialmente como compañero de trabajo en el laboratorio, han hecho posible que el trabajo fuese realizado en un ambiente cordial, agradable y dinámico, lo cual ha contribuido de manera fundamental en la realización de esta Tesis.

Al Prof. Dr. D. Salvador González Barón, mi agradecimiento por la dirección de este trabajo. Por haber puesto a mi disposición desde mi llegada a este Departamento todos los medios necesarios para la realización de esta Tesis, así como su confianza. Por permitir que participara desde el comienzo en labores de investigación y por su disposición siempre abierta a ayudar más allá de lo estrictamente necesario.

Me gustaría destacar, además de sus ya probadas cualidades científicas y dilatada experiencia, su faceta humana. Sin ella, este Departamento no sería lo que ha sido y es actualmente. Por último,

agradecerle su paciencia y su constante ánimo que tanto me han ayudado en la consecución de este trabajo.

Al **Prof. Dr. D. José Pablo Lara Muñoz**, por aportar su experiencia como investigador en áreas similares a las planteadas en esta Tesis, lo cual me ha sido de gran ayuda en la aclaración de muchas dudas. Además de por su orientación, asesoramiento y constantes muestras de apoyo en todos los aspectos, entre los que destaco sus excelentes cualidades personales y científicas que hacen que el ambiente de trabajo sea el óptimo para la realización de nuestro trabajo.

Al **Prof. Dr. D. José Ángel Narváez Bueno**, por sus magníficas cualidades tanto científicas como humanas, las cuales han garantizado y favorecido la realización de este trabajo en un ambiente cordial y dinámico.

Al **Prof. Dr. D. José Ángel Aguirre Gómez**, por haber contribuido en la preparación histológica de los cerebros y en las fotografías de las áreas de registro, además de construir con su ánimo y su buen humor un estupendo ambiente de trabajo.

A la **Dra. Dña. Zaida Díaz** y a la **Dra. Dña. María García**, que han mostrado en todo momento un sincero interés por la evolución de mi trabajo, además de aportarme su ánimo constante y brindarme su amistad.

A todas las personas que han pasado por la secretaría del Departamento, en especial a **D. Miguel Ponce, Paz Sanjuán, Isabel Barceló y Estrella Lara** por su disponibilidad y colaboración en la resolución de muchos aspectos de importancia para la elaboración de la tesis y por su grata compañía en todo momento.

A todos los profesores y colaboradores del Departamento por su apoyo continuo, su interés y su ánimo constante, en especial a la Dra. Dña. Carmen Montes, la Dra. Dña. Amelia Díaz, el Dr. D. José Rioja, el Dr. D. Miguel Ángel Barbancho, Delia y Manolo.

Por último, y no menos importante, me gustaría dedicar este trabajo a toda mi Familia, con especial énfasis a mi mujer, Elena y mi hija, Carla; a mis padres y a mi hermano Curro. El apoyo y estímulo constantes, sin obviar el interés y el cariño recibidos de todos ellos, han sido determinantes para la realización y consecución de este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El mesencéfalo. Estructura y funciones.	3
1.2. Sustancia Gris Periacueductal (SGP)	7
1.2.1. Organización anatómica funcional de la SGP	9
1.2.2. Aferencias y eferencias de la SGP.	10
1.2.3. Propiedades químicas de la SGPdl	16
1.2.4. Funciones de la SGP	17
1.2.4.1. Respuesta al estrés	17
1.2.4.2. Modulación del dolor	18
1.2.4.3. Otras funciones	20
1.2.4.4. Correlaciones clínicas	22
1.3. Respuesta de defensa	25
1.3.1 Áreas participantes	25
1.3.2. Funciones de la respuesta de defensa	27
1.3.3. Respuesta de defensa. Papel de la SGPdl	33
1.4. Área A5	39
1.4.1. Aspectos generales del Área A5	39
1.4.2. Aspectos morfofuncionales del Área A5	43
1.4.2.1. Conexiones aferentes	43
1.4.2.2. Conexiones eferentes	45
1.4.3. Función del Área A5 en el control cardiorrespiratorio	49
1.4.3.1. Papel del Área A5 en el control cardiovascular	49
1.4.3.2. Papel del Área A5 en el control respiratorio	52
1.4.4. Otras funciones del Área A5. Control nociceptivo	59
1.4.5. Aspectos Fisiopatológicos del Área A5	63
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1. Animal de experimentación	71
3.2. Preparación quirúrgica	73
3.3. Variables registradas y material utilizado	77

3.4. Fármacos utilizados	87
3.5. Protocolo experimental	89
3.6. Procesamiento histológico	93
3.7. Tratamiento estadístico	95
4. RESULTADOS	97
4.1. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl)	97
4.2. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de PBS (phosphate buffer saline) en el Área A5	99
4.3. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de Muscimol en el Área A5	111
4.4. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5	125
4.5. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de DAP5 en el A5	139
4.6. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de CNQX en el A5	153
4.7. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de MCPG en el A5	167

5. DISCUSIÓN	181
5.1. Consideraciones generales	181
5.2. Metodología utilizada	187
5.3. Estimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl)	191
5.3.1. Efectos respiratorios y cardiovasculares	191
5.4. Efecto de la microinyección de Muscimol en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl	197
5.5. Efecto de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl	201
5.6. Efecto de la microinyección de DAP5 en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl	203
5.7. Efecto de la microinyección de CNQX en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl	205
5.8. Efecto de la microinyección de MCPG en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl	207
5.9. Hipótesis derivadas de los resultados	209
6. CONCLUSIONES	219
7. BIBLIOGRAFÍA	221
8. APÉNDICE	285

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo que se demostró que el tronco del encéfalo desempeña un papel esencial en la regulación cardiorrespiratoria. Posteriormente, se demostró también que varias regiones del sistema nervioso central ejercen una gran influencia en la función cardiorrespiratoria. Dentro de estas regiones podemos señalar la protuberancia, mesencéfalo, hipotálamo o la amígdala.

Todavía no está totalmente esclarecida la manera en la que estas estructuras interactúan entre sí para coordinar e integrar respuestas cardiorrespiratorias tanto ante estímulos internos como externos. Se ha trabajado con cada una de estas regiones con el objetivo de intentar dilucidar el posible papel que juegan en la regulación cardiorrespiratoria en condiciones normales o ante una determinada situación de estrés.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de dos de estas regiones implicadas en el control cardiorrespiratorio: el mesencéfalo y la protuberancia. Concretamente hemos estudiado la interacción entre dos estructuras dentro de cada región. En el mesencéfalo nos hemos ceñido al estudio de una zona denominada Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) y en la protuberancia hemos estudiado el Área A5 catecolaminérgico (A5). Hemos intentado también aportar nuevos datos sobre su relación funcional y el posible papel del glutamato en dichas interacciones.

A continuación, explicaremos brevemente los conocimientos actuales existentes sobre el papel de estas dos estructuras en el control cardiorrespiratorio. Comenzaremos hablando de la SGPdl. Más tarde, estudiaremos el Área A5 para terminar matizando los conocimientos

actuales sobre aspectos morfofuncionales que llevan a plantear la hipótesis de la posible interrelación entre estas dos estructuras.

1.1. El mesencéfalo. Estructura y funciones

El mesencéfalo, también conocido como cerebro medio, se encuentra localizado en la parte más rostral del tallo cerebral, por encima de la protuberancia y por debajo del diencefalo. En cuanto a su anatomía macroscópica las estructuras que más resaltan a simple vista son los tubérculos cuadrigéminos, con cuatro elevaciones que se encuentran presentes en la vista dorsal. Están dispuestos en pares, también conocidos como colículos. Los colículos superiores se relacionan con la vista, mientras que los colículos inferiores se relacionan con la audición.

Dos de las funciones principales del mesencéfalo son las de la vista y la audición gracias a estos colículos superiores e inferiores. También controla parte del movimiento de la cabeza en coordinación con los movimientos oculares, así en caso de que llegue a fallar o no funcione la vía corticoespinal va a corregir o reemplazar a esta vía dependiendo de cual sea el problema, aunque nunca como lo hacía la vía original.

En clínica podemos encontrar un elevado número de patologías relacionadas con alguna mal función del mesencéfalo. Posiblemente la más importante entre ellas sea el Parkinson, que se origina por una falta de dopamina en la sustancia negra, que causa problemas de tipo motores que son muy característicos, como el temblor de la mano en reposo, la rigidez de los músculos, y una marcha característica.

De esta zona surgen o se desarrollan los pares craneales motor ocular común y troclear, encargados de los movimientos de los ojos.

Estos pares se desarrollan principalmente en los colículos superiores y por ende son de mayor tamaño. También aquí se encuentran

las vías encargadas de los procesos de los movimientos del cuello en relación con los movimientos de los ojos y los reflejos de la pupila tanto directos (miosis y midriasis) como el reflejo consensual y, por último, el movimiento de mirada vertical.

El colículo inferior está organizado en tres partes: núcleo central, núcleo pericentral y el núcleo externo. El núcleo central es el principal relevo de la audición, para que los sonidos de alta frecuencia se vayan a la parte ventral y los de baja frecuencia a la parte dorsal del núcleo. También se sabe que el núcleo pericentral trabaja en conjunto con el colículo superior ya que sirve para dirigir la atención del sonido, se refiere a la acción que se lleva a cabo al girar al lugar de origen de un sonido que nos llame la atención.

La irrigación la lleva a cabo principalmente la arteria basilar por las ramas paramediana, cerebelosa superior y cerebelosa posterior. Esto es de vital importancia debido a que un fallo en ésta, provocaría déficits nutricionales en las células de esta estructura, que pueden causar síndromes e infartos como el síndrome vascular mesencefálico.

	CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS	CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES
Colículos superiores	Se denomina pretectum *Brazo conjuntival superior: comunica el colículo superior con el núcleo geniculado lateral	Función visual (reciben aferencias desde el tracto óptico, siendo estación de relevo entre este y el núcleo geniculado lateral)
Colículos inferiores	Varios núcleos: central, pericentral, exterior. *Brazo conjuntival inferior: comunica el colículo inferior con el núcleo geniculado medial	Función auditiva (reciben aferencias desde los núcleos cocleares, siendo estación de relevo entre estos y el núcleo geniculado medial)
Acueducto mesencefálico	Localizado centralmente	Comunicación entre el tercer y cuarto ventrículo.
Sustancia Gris Periacueductal	Alrededor del acueducto	Recibe aferencias desde núcleos vegetativos hipotalámicos. Implicada en la modulación del dolor y estrés.
Sustancia negra	Dorsal a los pedúnculos cerebrales. -pars compacta -pars reticulata	Forma parte de los ganglios de la base.
Núcleo rojo	Dorsal a la sustancia negra. *Tracto rubroespinal. Nace en núcleo rojo cruzando sus axones la línea media y dirigiéndose hasta el nivel torácico de la médula.	Centro de relevo de vías reflejas cerebelosas y estriadas. Parte esencial de las vías extrapiramidales corticales. Control del tono muscular.
Núcleo III nervio craneal	Ventral a la sustancia gris periacueductal, craneal al núcleo del IV nervio craneal y a la altura del colículo superior. *Fascículo del III nervio craneal: las fibras atraviesan el núcleo rojo saliendo por la parte anterior del mesencéfalo, mediales a los pedúnculos cerebrales.	Inervación músculos rectos superior-inferior-interno, oblicuo menor y elevador del párpado. Inervación parasimpática pupilar
Núcleo del IV nervio craneal	Sito en la región ventral de la SGP, en el nivel del colículo inferior. *Fascículo del IV nervio craneal: sigue un curso posterior e inferior al acueducto y se decusa en la parte posterior del mesencéfalo, emergiendo cerca de la línea media dorsal, justo bajo el colículo inferior	Inervación músculo oblicuo superior

Núcleo mesencefálico del V nervio craneal	Lateral al acueducto mesencefálico. *Fascículo del V nervio craneal: se dirige hacia caudal.	Región sensitiva (recibe información propioceptiva de los músculos de la masticación)
Núcleo pretectal	Inmediatamente superior al colículo superior a nivel de la comisura posterior	Implicado en el reflejo pupilar
Formación reticular	Situada entre la Sustancia Gris Periacueductal y lemnisco lateral y tracto espinotalámico.	Centro locomotor, centro cardiorrespiratorio, centro del vómito, regulación ritmos circadianos, etc
Fascículo longitudinal medial	Situado anterior y lateralmente al núcleo III nervio craneal	Lleva fibras hacia los núcleos oculomotores y núcleos motores bulbares y medulares. Control reflejo de los movimientos de la cabeza y los ojos
Tracto espinotalámico lateral	Localizado lateralmente a la formación reticular.	Vía del dolor y la temperatura
Lemnisco medial	Localizado lateralmente a la formación reticular.	Vía de la sensibilidad profunda consciente y sensibilidad epicrítica
Pedúnculos cerebelosos	Su decusación se localiza en la porción central del tegmento, anterior al acueducto mesencefálico.	Conexión entre cerebelo y mesencéfalo.
Pedúnculos cerebrales	Localizado ventralmente. Contienen los haces: -corticobulbar (fibras temporo-pontinas): quinto lateral. -corticoespinal: porción media. -corticopontino (fibras fronto-pontinas): quinto medial.	Vía motora. El haz corticoespinal presenta organización somatotópica para la musculatura de la cabeza y extremidades (ordenadas de medial a lateral).

Tabla 1. Estructuras anatómicas del mesencéfalo.

1.2. Sustancia Gris Periacueductal (SGP)

A modo de resumen, podemos decir que la Sustancia Gris Periacueductal (SGP) es una interfaz tanto anatómica como funcional entre el prosencéfalo y la protuberancia y tiene como función principal el integrar las respuestas activas y pasivas ante estímulos internos o externos. Anatómicamente está estructurada por cuatro columnas longitudinales, a las que se les denomina: dorsomedial (dm), dorsolateral (dl), lateral (l) y ventrolateral (vl). Entre ellas existen diferencias tanto funcionales como de conexiones anatómicas y propiedades químicas (Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001; Vianna y Brandao, 2003).

Entre todas las aferencias que recibe, las más importantes son las que llegan desde el córtex prefrontal, amígdala, hipotálamo y desde rutas nociceptivas. Gracias a sus conexiones con distintos núcleos protuberanciales, la SGP coordina diferentes patrones de respuestas cardiorrespiratorias, motoras y nociceptivas. Estas respuestas varían en función del tipo de estrés y de la percepción subjetiva del propio individuo ante la supuesta amenaza. Otras funciones de la SGP son: la vocalización, micción, termorregulación, participación en los mecanismos de vigilia y sueño (REM).

A nivel clínico, se sabe que su funcionamiento está afectado en distintos desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer y diferentes atrofas multisistémicas. Además, la estimulación de la SGP ha sido utilizada para controlar el dolor neuropático, y existen evidencias recientes que sugieren que podría ser útil para reducir o aliviar la hipertensión refractaria (Behbehani, 1995; Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2002; Heinricher y cols., 2009;

Zhang y cols., 2007; Haxhiu y cols., 2002; Jurgens, 2009; Holstege, 2005; Kavia y cols., 2005).

1.2.1. Organización anatómico funcional de la SGP

La SGP se continúa con la sustancia gris periventricular y rodea el acueducto mesencefálico excepto en su parte ventral, la cual contiene rostralmente núcleos con función oculomotora y caudalmente el rafe dorsal. Las 4 subdivisiones de la SGP (dorsomedial (dm), dorsolateral (dl), lateral (l) y ventrolateral (vl)) han sido establecidas en base a su citoarquitectura, quimioarquitectura y patrones de conectividad (Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001; Vianna y Brandao, 2003). La SGP contiene diferentes tipos de neuronas que utilizan diferentes tipos de neurotransmisores (L-glutamato, GABA, opioides (encefalinas), sustancia P, neurotensina...). La SGPdl contiene, además, neuronas que expresan NADPH-diaforasa y sintetizan óxido nítrico (Onstott y cols., 1993). La SGPvl contiene un grupo de neuronas dopaminérgicas (Lu y cols., 2006). Por último, la SGP tiene expresión de receptores de todo tipo, como son NMDA (Siegfried y Souza, 1989), GABAA (Behbehani y cols., 1990), μ -opioides (Fields, 2004), neuroquinina-1 (Gregg y Siegel, 2003) y TRPV1 (Palazzo y cols., 2010).

1.2.2. Aferencias y eferencias de la SGP

Como hemos introducido anteriormente, la SGP es un componente esencial del llamado “sistema motor emocional” (Holstege y cols., 1996). Este sistema o red de distribución recibe aferencias desde el córtex prefrontal medial y el cíngulo anterior y proyecta a zonas protuberanciales que controlan patrones específicos de respuestas tanto motoras como autonómicas, y modula tanto la excitabilidad nociceptiva del asta dorsal ante estímulos dolorosos como el nivel de excitabilidad de los reflejos espinales (Holstege y cols., 1996).

La SGP recibe aferencias desde el prosencéfalo, protuberancia y las neuronas sensitivas del asta dorsal y del núcleo del trigémino. Estos inputs de información poseen patrones diferentes de entrada a las diferentes columnas de la SGP. De manera más concreta, el córtex prefrontal provee de la entrada de información más potente desde el prosencéfalo. La pared media del córtex prefrontal conecta con la columna dorsolateral de la SGP, el giro cíngulo anterior alcanza la columna lateral, ventrolateral y dorsomedial (An y cols., 1998). Las aferencias desde la amígdala se originan desde el núcleo central y la porción ventrolateral del núcleo basal; las aferencias desde el hipotálamo se originan desde el núcleo preóptico medial, núcleo anterior, núcleo periventricular, núcleo ventromedial, núcleo posterior, núcleo supramamilar y áreas laterales hipotalámicas (An y cols., 1998).

La SGP recibe profusas conexiones tanto noradrenérgicas como adrenérgicas desde el bulbo ventrolateral (grupos A1 y C1) y dorsomedial (grupos A2 y C3) (Herbert y Saper, 1992).

La información nociceptiva le llega desde la Lámina I del asta dorsal superficial y el núcleo caudal del trigémino contralaterales. Estas

conexiones llegan hasta las zonas ventrolateral y lateral de la SGP y se organizan somatotópicamente. Las proyecciones trigeminales finalizan en la SGP rostral y las proyecciones cervicales y lumbares espinales van llegando progresivamente hasta niveles más caudales (Yeziarski, 1988).

La SGP proyecta al prosencéfalo, protuberancia y médula espinal. Las proyecciones al prosencéfalo alcanzan al tálamo e hipotálamo (Herbert y Saper, 1992; Yeziarski, 1988). Las proyecciones hacia los núcleos intralaminar y medial del tálamo podrían servir como una puerta de escape o conexión con el córtex prefrontal, amígdala y ganglios basales (Krout y Loewy, 2000). Otras proyecciones muy importantes, por lo profuso, son las que emite hacia el hipotálamo, concretamente a las zonas anterior, medial y posterior. La ruta principal para las proyecciones diencefálicas de la SGP son a través del nudo periventricular (Mantyh, 1983). Con la excepción de la columna dorsolateral, todas las demás columnas de la SGP proyectan a la protuberancia (parte inferior). La SGP proyecta de manera densa al núcleo cuneiforme, locus cerúleus, núcleo de Barrington (centro de la micción protuberancial), núcleos motores de la región reticular protuberancial y bulbar, complejo parabraquial, núcleos ambiguo y retroambiguo, bulbo rostral y caudal ventrolateral y bulbo rostral ventromedial (incluido el rafe magno y rafe pálido) (Mantyh, 1983).

La mayoría de estos destinos son centros premotores que, a su vez, contactan con otros centros sensitivos, motores o núcleos autonómicos de la protuberancia y médula espinal (Holstege y cols., 1996). Las conexiones de la SGP en humanos han sido muy estudiadas y en experiencias recientes realizadas en pacientes que han recibido estimulación profunda de la SGP por dolor neuropático han mostrado conexiones ascendentes de la SGPd con la parte posterior ventral del tálamo y la corteza primaria somatosensorial, y conexiones de la SGPv con las cortezas cinguladas prefrontal ventromedial y anterior, amígdala y

núcleo accumbens. Las columnas SGPd y SGPv muestran, además, diferentes conexiones con el bulbo dorsomedial ipsilateral y el cerebelo (Sillery y cols., 2005). Estos hallazgos confirman la conectividad tan variada de las diferentes partes de la SGP.

En particular, hay proyecciones directas de la corteza auditiva primaria y de la zona 18 (un área cortical visual secundaria en la rata) a la SGPdl pero no a otras subregiones de la SGP (Benzinger y Massopust, 1983; Newman y cols., 1989). También hay una proyección de la zona 18 al colículo superior que está por encima y adyacente a la SGPdl, (Benzinger y Massopust, 1983). Es más, hay una proyección desde el colículo superior a la SGP, que se dirige exclusivamente a la SGPdl. Además existen inputs exclusivamente hacia la SGPdl y no a otras subregiones de la SGP, desde dos núcleos que se sabe que tienen un papel importante en el control de los movimientos oculares como son el núcleo praepositus hypoglossi y el núcleo periparabigeminal (Klop y cols., 2005, 2006). Ambos también proyectan al colículo superior (Klop y cols., 2005, 2006). Klop y cols., (2006) han sugerido que estos inputs permiten que las neuronas de la SGPdl puedan responder a las señales visuales generadas por la presencia de objetos en el campo visual externo en lugar de cambios en las señales visuales causadas sólo por los movimientos del ojo. Consistente con esta hipótesis, las neuronas en la SGPdl se inhiben justo antes y durante los movimientos rápidos de los ojos (movimientos sacádicos) (Kase y cols., 1986).

Una de las proyecciones más importantes que recibe la SGPdl proviene de las neuronas del núcleo dorsal premamilar (PMD) en el hipotálamo, en particular su porción ventrolateral (Motta y cols., 2009). Las lesiones en el PMD o el bloqueo de los receptores excitatorios en el PMD reducen en gran medida la respuesta de comportamiento defensivo ya sea a la presencia de un depredador, o al olor de éste (Markham y

cols., 2004; Blanchard y cols., 2005; Do Monte y cols., 2008;. Motta y cols., 2009).

La parte ventrolateral del PMD recibe su principal entrada de información desde proyecciones directas desde el núcleo hipotalámico ventromedial, parte dorsomedial (VMH), que a su vez recibe proyecciones desde dos zonas de la amígdala, la parte posteroventral del núcleo medial y la parte posterior de núcleo basomedial (Motta y cols., 2009). La parte posteroventral de la amígdala medial se activa por el olor del depredador (McGregor y cols., 2004), mientras que se cree que la parte posterior del núcleo basomedial es activada más por las señales que indican la presencia de un depredador (Motta y cols., 2009).

La parte ventrolateral del PMD también recibe una entrada importante del área hipotalámica anterior (AHA) (Risold y cols., 1994), que junto con el PMD y VMH son parte del sistema que genera la respuesta de defensa desde el hipotálamo medial (Swanson, 2000). También hay una fuerte proyección de una región lateral en lugar circunscrita en el área hipotalámica anterior directamente a la SGPdl (Semenenko y Lumb, 1992). La activación de ésta evoca aumentos de la presión arterial, de flujo sanguínea en las extremidades y de la frecuencia respiratoria, similar a la respuesta cardiovascular asociada a la respuesta de defensa (Lumb y Lovick, 1993).

La SGPdl en la rata recibe también proyecciones directas de las neuronas del córtex prefrontal medial (PFC), en particular desde su porción caudodorsal (córtex cingulado anterior y prelímbico caudal) (Floyd y cols., 2000; Gabbott y cols., 2005). Estas regiones corticales también proyectan al núcleo hipotalámico anterior y al VMH (Keay y Bandler, 2001), por lo que también pueden influir indirectamente sobre las neuronas de la SGPdl a través de estas regiones hipotalámicas. Se cree

que el córtex prefrontal medial, incluyendo aquellas subregiones que proyectan hacia la SGPdl, está implicado en el razonamiento cognitivo complejo y la interpretación de los estímulos estresantes (Bandler y cols., 2000). En primates, las regiones corticales que son homólogas a la porción caudodorsal del córtex prefrontal medial son las zonas 10, 25 y 32, y los estudios anatómicos han demostrado que estas áreas son el origen de una proyección densa a la SGPdl (An y cols., 1998; Bandler y cols., 2000). Así mismo, daños en el córtex prefrontal en humanos afectan su capacidad para predecir las consecuencias de las conductas de riesgo, y también reduce las respuestas autónomas que normalmente se asocian con el estrés emocional en los comportamientos de riesgo (Bechara y cols., 1997).

En resumen, las conexiones aferentes a la SGPdl surgen de un número de núcleos que reciben entradas relacionadas con las señales visuales, auditivas y olfativas, o de los núcleos que procesan tales señales. Es particularmente sorprendente que, a excepción de la proyección desde la PMDvl, todas estas entradas son exclusivas de la SGPdl. Por el contrario, hay muchas entradas a la SGP desde varias regiones (por ejemplo, núcleo central de la amígdala, el área preóptico medial, campo tegmental pontinomedular, y la médula espinal) que proyectan a todas las subregiones SGP excepto al SGPdl (Bjorkeland y Boivie, 1984; Wiberg y Blomqvist, 1984; Rizvi y cols., 1991, 1992; Herbert y Saper, 1992; Klop y cols., 2005). Es por esto que podemos afirmar que las aferencias a la SGPdl son altamente específicas y distintivas.

Del mismo modo, las eferencias de la SGPdl también son altamente específicas y claramente diferentes a las de las otras subregiones de la SGP. Si atendemos a las eferencias más importantes de la SGP, hay fuertes proyecciones hacia la línea media del bulbo raquídeo, médula rostral ventrolateral (que contiene neuronas simpáticas

premotoras (Dampney y cols., 2003; Guyenet, 2006)), así como al grupo respiratorio ventral desde SGPdm, SGPI y SGPvl (Beitz y cols., 1983; Van Bockstaele y cols., 1991; Cowie y Holstege, 1992; Gaytan y Pasaro, 1998). En contraste, la SGPdl no proyecta a ninguna de estas regiones (Beitz y cols., 1983; Van Bockstaele y cols., 1991; Cowie y Holstege, 1992; Gaytan y Pasaro, 1998). Las neuronas de la SGPdl proyectan, sin embargo, al núcleo cuneiforme (Redgrave y cols., 1988; Bernard y cols., 1989). No existe una proyección significativa al núcleo cuneiforme de otras subregiones de la SGP.

El segundo objetivo más importante de las proyecciones desde la SGPdl es el complejo parabraquial, específicamente su núcleo superior lateral (Krout y cols., 1998). Aunque también hay proyecciones al complejo parabraquial desde las demás subregiones de la SGP, la SGPdl es la única subregión que proyecta exclusivamente al subnúcleo parabraquial lateral superior (Krout y cols., 1998). Es interesante resaltar que también hay una proyección muy densa desde el núcleo parabraquial lateral superior a la parte núcleo hipotalámico ventro medial (DMH) (Bester y cols., 1997) que, como se mencionó anteriormente, es parte del sistema que produce la respuesta de defensa desde el hipotálamo medial (Swanson, 2000).

1.2.3. Propiedades químicas de la SGPdl

Al igual que sucede con las conexiones anatómicas, las propiedades químicas de la SGPdl son claramente diferentes de las otras subregiones de la SGP. Esto queda patente, sobre todo, en el caso de la NADPH diaforasa o la óxido nítrico sintasa (NOS), marcadores de las neuronas que sintetizan óxido nítrico (Herbert y Saper, 1992; Onstott y cols., 1993; Bandler y Shipley, 1994). Las neuronas de la SGP que contienen NADPH diaforasa se limitan básicamente a la subregión de la SGPdl. Del mismo modo, la enzima acetilcolinesterasa en la SGP también se encuentra sólo en la SGPdl (Illing y Graybiel, 1986). Por contra, la enzima citocromo oxidasa no está presente en la SGPdl pero sí lo está en el resto de subregiones de la SGP (Conti y cols., 1988). Otra característica distintiva de la SGPdl es que contiene una densidad mucho mayor de neuronas y terminales GABA que la SGPdm adyacente y la SGPI (Barbaresi, 2005, 2010). También hay una mayor densidad de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato en la SGPdl en comparación con las otras subregiones de la SGP aunque, en este caso, la diferencia es menos marcada que en el caso de las neuronas y terminales GABA (Albin y cols., 1990; Azkue y cols., 1997). Por último hay que añadir que se describe una densidad muy baja de terminales inmunorreactivos para la dopamina- β -hidroxilasa en la SGPdl y SGPdm en comparación con la SGPI y SGPvl (Herbert y Saper, 1992), lo que indica que estas subregiones no reciben una inervación adrenérgica significativa.

1.2.4 Funciones de la SGP

1.2.4.1. Respuesta al estrés

La SGP es un componente esencial de una red neuronal que se activa en respuesta tanto a estímulos internos (estrés interno) como los dolorosos y amenazas externas, como la presencia de un depredador. Esta red neural incluye varias áreas del córtex prefrontal. Córtex cingulado anterior, amígdala e hipotálamo, que conectan específicamente con las distintas columnas que conforman la SGP. Estas conexiones forman circuitos paralelos que son activados en función de las características de los estímulos recibidos, e inician diferentes respuestas moduladoras, ya sean dolorosas, autonómicas o motoras (Bandler y Shipley, 1994; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2002).

Los animales han desarrollado varios tipos de estrategias para defenderse de los diferentes tipos de estímulos que suponen una amenaza o estrés. Según Bandler y cols., (2000) y Keay y Bandler (2001), las estrategias se pueden clasificar como estrategias de afrontamiento activo o pasivo. El comportamiento defensivo activo se caracteriza por un aumento de la actividad somatomotora junto a cambios cardiovasculares y respiratorios que tienen el efecto de aumentar el flujo de sangre y el suministro de oxígeno a los músculos esqueléticos para su activación. Esta respuesta puede ser activada por estímulos de los que se puede huir y, por tanto, que activen la huida o escape del animal, tales como la presencia de un depredador o dolor cutáneo.

Por el contrario, el comportamiento defensivo pasivo se caracteriza por disminución de la actividad somatomotora (por ejemplo, quiescencia) acompañado por cambios cardiovasculares apropiados, incluyendo reducción de la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Esta respuesta

es provocada por estímulos que son ineludibles, tales como dolor de origen profundo en los músculos o vísceras, o hemorragias (Carrive, 1993; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001).

La microestimulación química de la SGP muestra que las diferentes columnas de la SGP organizan diferentes tipos de respuestas en función del estímulo recibido, ya sea doloroso o de otro tipo (Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2002; Heinricher y cols., 2009; Nashold y cols., 1969; Keay y Bandler, 2001; Bandler y cols., 2000). La SGPI y SGPdl inician la respuesta de defensa (huída o lucha). Esta respuesta está asociada con taquicardia, hipertensión y redistribución del flujo sanguíneo. Esta respuesta simpatoexcitadora está mediada por el bulbo rostroventrolateral, el cual activa neuronas preganglionares simpáticas que controlan a los efectores cardiovasculares (Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001; Hayward, 2007; de Menezes, 2009). Por el contrario, las neuronas de la SGPvl, inician respuestas simpatoinhibidoras (hipotensión y bradicardia) que están asociadas a inmovilidad e hiporeactividad al entorno. Esta respuesta vasodepresora está mediada por neuronas del bulbo ventromedial y el núcleo del rafe pálido (Vagg y cols., 2008), los cuales inhiben a las neuronas simpatoexcitadoras del bulbo rostroventrolateral. A nivel respiratorio también se producen respuestas específicas en función de si estimulamos la región de la SGGPdl (taquipnea) o de la SGPvl (bradipnea) (Tavares y Lima, 2007). Estas respuestas son mediadas por proyecciones a interneuronas premotoras a nivel de la protuberancia y el núcleo retroambiguo a nivel del bulbo.

1.2.4.2. Modulación del dolor

La SGP es un componente esencial en el circuito neuronal implicado en la modulación del dolor. El control que ejerce es dual,

inhibidor o excitador, a nivel de la transmisión nociceptiva del asta dorsal medular y del núcleo del trigémino. Esta red neuronal contiene conexiones a nivel del córtex prefrontal y del córtex cingulado, del hipotálamo, de la amígdala, de la formación reticular protuberancial, del bulbo rostroventrolateral y caudal (Heinricher y cols., 2009; Fields, 2004; Tavares y Lima, 2007) y las neuronas de esta red expresan receptores opioides y de TRPV1 (Fields, 2004; Palazzo y cols., 2010) e intervienen en la analgesia mediante opioides, placebo y acupuntura (Heinricher y cols., 2009; Fields, 2004; Parry y cols., 2008; Valet y cols., 2004; Wager y cols., 2007).

El balance entre inhibición o facilitación nociceptiva es dinámico, y puede ser alterado en diferentes estados comportamentales, emocionales y patológicos (Keay y Bandler, 2002; Heinricher y cols., 2009). La estimulación de la SGP produce típicamente analgesia como demostró por primera vez Reynolds en rata (Reynolds, 1969), y posteriormente se confirmó en diferentes especies, incluyendo humanos (Nashold y cols., 1969; Hosobuchi y cols., 1977; Baskin y cols., 1986).

Hay varios estudios que demuestran como la estimulación de la SGP inhibe fuertemente la actividad de las neuronas superficiales del asta dorsal medular que conducen la información nociceptiva procedente de fibras tipo C, aunque no afecta o incluso pueden potenciar la nocicepción mediada por fibras tipo A (Heinricher y cols., 2009; Simpson y cols., 2008). El efecto inhibitor sobre la neurotransmisión nociceptiva que tiene la SGP es resultado de una respuesta coordinada de las diferentes columnas que la conforman, y va a depender del tipo de estímulo doloroso recibido (Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Bandler y cols., 2000; Nashold y cols., 1969; Keay y Bandler, 2001; Bandler y cols., 2000). La SGPI y dl producen una respuesta simpatoexcitadora y una analgesia de corta duración ante estímulos también de corta duración a nivel

cutáneo, involucrando neurotransmisión no opioide (Keay y Bandler, 2001; Lumb, 2004; Bandler y cols., 2000). Por el contrario, dolor somático profundo, visceral o superficial repetitivo activa a la SGPvl y produce analgesia de larga duración dependiente de opioides y asociada a inmovilidad y vasodepresión (Keay y Bandler, 2001; Bandler y cols., 2000).

La SGP ejerce su función moduladora a nivel de estos circuitos que llevan la información nociceptiva principalmente por su proyección directa sobre el bulbo rostroventrolateral, incluyendo al Rafe Magno y, en parte, por sus conexiones con el Área A5 protuberancial (Behbehani, 1995; Heinricher y cols., 2009; Fields, 2004). El bulbo rostroventrolateral ejerce un control bidireccional sobre el procesamiento nociceptivo, a nivel de 2 tipos celulares. Células que son activadas por opioides e inhiben la nocicepción, y células que son inhibidas por los opioides y promueven las respuestas nociceptivas (Fields, 2004). Así, el balance de la actividad de ambas poblaciones determina el umbral nociceptivo a nivel del asta dorsal medular.

1.2.4.3. Otras funciones

La SGP tiene un papel crítico en la vocalización en respuesta a estímulos dolorosos (Jurgens, 2009). Hay estudios que demuestran que la SGPI y SGPvl integran la actividad espiratoria y laríngea necesaria para la generación de la vocalización (Subramanian y cols., 2008). El control voluntario de la vocalización incluye al córtex cingulado, el cual proyecta a la SGP. La SGP presenta conexiones con la formación reticular del bulbo que rodea al núcleo ambiguo, el cual proyecta, a su vez, a motoneuronas del asta ventral medular que controlan la espiración, al propio núcleo ambiguo (controla la fonación) y a los núcleos trigémino, facial e hipogloso

que controlan la articulación. Las lesiones de la SGP producen mutismo tanto en animales como humanos (Jurgens, 2009, Esposito y cols., 1999).

La SGP actúa como intermediaria entre la información aferente proveniente de la vejiga y las influencias moduladoras del mesencéfalo que controlan la micción. Normalmente, el vaciamiento de la vejiga implica la coordinación entre el reflejo espinobulbar y el centro de la micción protuberancial (Fowler y cols., 2008). La SGPvl recibe aferencias Aδ desde la vejiga y conduce esta información hasta el centro de la micción protuberancial (Holstege y cols., 2010). Hay estudios tanto en animales como en humanos (Liu y cols., 2004; Fowler y Griffiths, 2010) que demuestran que la SGP se activa tanto durante el llenado como durante el vaciado en la micción. Se ha realizado un modelo de las posibles conexiones funcionales entre la SGP y otros centros nerviosos mesencefálicos durante el control de la micción (Fowler y Griffiths, 2010). Según este modelo el córtex medial prefrontal ejerce una inhibición tónica sobre la SGP durante el almacenamiento de la orina, mientras que la supresión de esta inhibición permitiría a la SGP la activación del centro de la micción protuberancial cuando el sujeto de estudio desea orinar (Fowler y cols., 2008).

También se ha descrito una función interesante de la SGPvl en los mecanismos de sueño-vigilia, y en el paso de sueño no-REM a REM (Fuller y cols., 2007; Hsieh y cols., 2011). Se han descrito una serie de neuronas dopaminérgicas dentro de la SGPvl que están activas durante la vigilia y silentes durante el sueño y que poseen una gran cantidad de conexiones con otros centros que modulan la regulación del sueño-vigilia en hipotálamo y protuberancia (Lu y cols., 2006).

1.2.4.4. Correlaciones clínicas

La estimulación de la SGP y de regiones periventriculares adyacentes en pacientes con dolor crónico intratable produce una disminución de éste que está asociada con la liberación de opioides (Akil y cols., 1978) y se bloquea con la administración de naloxona (Hosobuchi y cols., 1977). Se ha podido comprobar que la estimulación de la SGP puede provocar una atenuación efectiva en la magnitud del dolor a largo plazo en determinados pacientes (Pereira y cols., 2007; Owen y cols., 2007). La estimulación cerebral profunda de la SGP o la zona periventricular en algunos casos puede disminuir el dolor entre un 50 y un 66%, los mejores resultados se obtienen en pacientes con síndrome del miembro fantasma, dolor de cabeza y anestesia dolorosa (Owen y cols., 2007); la mejor ubicación en humanos a la hora de estimular la SGP sería ubicar el electrodo en la SGPvI concretamente (Baskin y cols., 1986).

La estimulación de la SGP en humanos también produce cambios en la presión arterial y la frecuencia cardíaca y son consistentes con los cambios que se observan en animales experimentales (Green y cols., 2005; Green y cols., 2006). La estimulación de la SGPd produce un aumento de la actividad simpática y de la sensibilidad barorrefleja y puede reducir la severidad de la hipotensión ortostática en algunos pacientes (Green y cols., 2006). La estimulación de la SGPvI, que como hemos dicho con anterioridad es el mejor punto para inducir analgesia, está asociado con una disminución de la presión arterial (Green y cols., 2006). Otro estudio reciente muestra que la estimulación de la SGPv produce una predominancia relativa de la modulación vagal sobre la modulación simpática de la frecuencia cardíaca, la cual se correlaciona con la eficacia analgésica (Patel y cols., 2011). La estimulación de la SGPvI en pacientes con hipertensión refractaria produce una disminución duradera de la presión arterial (Patel y cols., 2011).

También se ha descrito que la SGP está afectada en algunas enfermedades neurodegenerativas, más concretamente, en Alzheimer (Parvizi y cols., 2000), Parkinson (Braak y cols., 2000) y atrofas multisistémicas (Benarroch y cols., 2010), pero no se sabe a ciencia cierta cuál es la correlación clínica concreta. Se ha descrito la presencia de cuerpos β -amiloides y proteína TAU anormalmente fosforilada en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Parvizi y cols., 2000). Presumiblemente, la SGP, su daño, contribuya a las manifestaciones comportamentales aberrantes en la enfermedad de Alzheimer y en las manifestaciones autonómicas en la enfermedad de atrofia multisistémica (Benarroch y cols., 2009; 2010).

1.3. Respuesta de defensa

1.3.1. Áreas participantes

Clásicamente, la respuesta de defensa en animales comienza a ser estudiada por Kabat y cols., (1935). Ellos demostraron que la estimulación eléctrica del Hipotálamo Caudal produce además de un aumento de la actividad cardiovascular (respuesta presora y taquicardia), un aumento de la actividad respiratoria. Esta respuesta excitadora cardiorrespiratoria era mayor en determinadas zonas del Hipotálamo Caudal como la Región Subfornical, Área Hipotalámica Lateral y campo H1 de Forel (Kabat, 1936).

Estas respuestas evocadas coordinadas por la estimulación del hipotálamo caudal son similares a los cambios autonómicos y respiratorios que ocurren durante una reacción de defensa, lucha o huida de animales o humanos conscientes ante una situación amenazante evocadora de estrés (Mancia y Zanchetti, 1981), o ante un estímulo agudo como un chorro de aire o un ruido fuerte (Schadt y cols., 1998). Por esta razón, a los núcleos del Hipotálamo Caudal cuya estimulación eléctrica provoca esta respuesta de defensa se les ha denominado clásicamente Área de Defensa Hipotalámica (aDH) (Hilton, 1982).

Sólo las áreas desde las cuales se obtiene una respuesta cardiovascular y conductual completa pueden ser clasificadas como **áreas de defensa**. En la rata, estas áreas son análogas a las descritas en gato (Abrahams y cols., 1960; Schramm y Bignall, 1971; Jordan, 1990) y similares a las descritas previamente para el perro (Bolme y cols., 1967), cobaya (Smith y cols., 1980), mono (Forsyth, 1970; Schramm y cols.,

1971) y conejo (Azevedo y cols., 1987; Gellman y cols., 1981; Shimada y Stitt, 1984).

La Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral es una de las zonas, no hipotalámicas, desde donde la microestimulación química reproduce el patrón típico de la respuesta de defensa (Hilton y Redfern, 1986; Yadley y Hilton, 1986; Carrive, 1991; Lovick, 1991).

1.3.2. Funciones de la respuesta de defensa

La estimulación de todas estas zonas del cerebro provoca una serie de cambios cardiorrespiratorios y autonómicos clásicos que caracterizan la respuesta de defensa, de lucha, de huida, de alerta o de estrés agudo en animales o humanos conscientes. Concretamente, la activación de estas zonas provoca incrementos de contractilidad ventricular izquierda (inotropismo) y del gasto cardíaco, produce vasodilatación coronaria, aumento de la resistencia vascular en el territorio renal y espláncnico con disminución de flujos arteriales y disminución de la resistencia vascular muscular por vasodilatación con aumento de flujo en el territorio muscular, todo ello acompañado de un incremento de la actividad del nervio simpático-renal. A nivel respiratorio no sólo aumenta la actividad frénica, lo cual produce un aumento del volumen corriente y, por tanto, del volumen minuto, sino que también produce un aumento de la frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio. Se producen asimismo otros cambios autonómicos o de conducta que incluyen la dilatación pupilar, la retracción de la membrana nictitante, piloerección y liberación de catecolaminas desde la glándula suprarrenal (Jordan, 1990).

La respuesta de defensa tiene como función la de preparar al animal para situaciones de estrés ambiental en la que se exige una respuesta locomotora rápida. Los componentes hemodinámicos de la reacción de defensa incrementan la perfusión de aquellas zonas vasculares que requieren oxígeno adicional durante el estrés. Por lo cual esta respuesta se caracteriza por hipertensión, taquicardia y redistribución del flujo sanguíneo dirigido desde las zonas abdominales y viscerales a los músculos esqueléticos de las extremidades. Adicionalmente esta respuesta viene acompañada de midriasis, aumentos en la frecuencia respiratoria y el volumen corriente (y, por tanto, el volumen minuto) y

disminución en las funciones gastrointestinales y urogenitales. Además, en animales no anestesiados, éstos expresan reacciones emocionales que incluyen la furia o la ira asociadas a los cambios autonómicos y respiratorios que ocurren durante la estimulación de estas áreas de defensa (Mancia y Zanchetti, 1981) o ante un estímulo agudo como un chorro de aire o un ruido fuerte (Schadt y cols., 1998).

Estudios realizados por miembros de nuestro grupo de investigación demuestran que la respuesta cardiorrespiratoria a la estimulación del área de Defensa Hipotalámica incluye facilitación del reflejo quimiorreceptor (Silva-Carvalho y cols., 1995), inhibición del reflejo barorreceptor (Coote y cols., 1979; Mifflin y cols., 1988b; Spyer, 1990) y del reflejo laríngeo apneico (Dawid-Milner y cols., 1995) por disfacilitación o inhibición de neuronas del NTS que reciben aferencias excitadoras barorreceptoras periféricas (Mifflin y cols., 1988a,b; Jordan y cols., 1988) mediante la activación de receptores GABA_A (Jordan y cols., 1988). Esto implica que la estimulación hipotalámica puede, en condiciones apropiadas, inhibir el reflejo barorreceptor a través del NTS. Asimismo, existen evidencias de que el área de Defensa Hipotalámica establece sinapsis con el bulbo Rostroventrolateral (RVLM) (Hilton y cols., 1983; Hilton y Smith, 1984) que participa, como efector final, en la respuesta cardiorrespiratoria al estrés (Strack y cols., 1989).

Hasta hace muy poco se desconocía si la respuesta evocada a la estimulación eléctrica de estas áreas cerebrales que participan en la respuesta de defensa era debida a la activación de somas específicos o a la activación de fibras de paso que tienen su origen fuera del hipotálamo caudal. Una parte de los autores han descrito que mediante la estimulación química con glutamato (Goodchild y cols., 1982), que activa específicamente cuerpos celulares sin afectar fibras de paso que tengan su origen en otros núcleos, el hipotálamo caudal es incapaz de provocar

la misma respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica (Bandler, 1982; Tan y Dampney, 1983; Hilton y Redfern, 1986; Spencer y cols., 1990). Estos autores llegaron a la conclusión de que la respuesta cardiovascular provocada por la estimulación eléctrica del hipotálamo caudal se debe a la activación de fibras de paso originadas en otros núcleos y no a cuerpos celulares localizados dentro del hipotálamo caudal.

Sin embargo, hay otros datos que demuestran que la estimulación química de neuronas del hipotálamo caudal provoca las mismas respuestas cardiorrespiratorias provocadas por estimulación eléctrica (DiMicco y cols., 1996; Fontes y cols., 2001; DiMicco y cols., 2002; Horiuchi y cols., 2004; Cao y cols., 2004; McDowall y cols., 2006).

Como se puede observar, hace tiempo que la disyuntiva fibras de paso vs somas está en el aire. Esto es debido a distintas causas, aunque las más probables sean las diferencias entre el agente anestésico utilizado, las diferencias en el nivel de anestesia, las concentraciones del neurotransmisor excitador utilizado, el volumen microinyectado del mismo o la zona específica de microinyección (Lipski y cols., 1988).

En la actualidad, desde nuestro grupo investigador se han realizado muchos trabajos en los que se han revisitado las conexiones desde regiones hipotalámicas que integran la respuesta de defensa como son el Área Perifornical Hipotalámica, el Núcleo Dorsomedial Hipotalámico y el Hipotálamo Lateral hacia otras zonas protuberanciales implicadas en el control cardiorrespiratorio, como son el Complejo Parabraquial (Dawid-Milner y cols., 1995; Díaz-Casares y cols., 2009, 2012) y el Área A5 (López-González y cols., 2013) demostrando que están implicadas en la respuesta de defensa y parecen presentar como neurotransmisor fundamental el glutamato.

Otras conexiones anatómicas importantes son las que establece el Núcleo Dorsomedial Hipotalámico con el NTS y el RVLM (Fontes y cols., 2001) y el Rafe pálido (Samuels y cols., 2002, 2004; Horiuchi y cols., 2004). Confirmando lo anterior, se han realizado trabajos en los que se demuestra que la activación del aDH, concretamente del Núcleo Dorsomedial Hipotalámico y Región Perifornical Hipotalámica, y de la dIPAG activan receptores serotoninérgicos del tipo 5HT₃ además de los GABA_a en el NTS sirviendo así como una posible fuente de inhibición de las neuronas barosensibles del NTS (Sévoz-Couche y cols., 2003; Comet y cols., 2004).

Hay autores que tienden a pensar que más que la inhibición o disfacilitación de neuronas barorreceptoras del NTS evocadas por estimulación del área de defensa hipotalámica descritas por Spyer, lo que se produce es una modulación o cambio en la sensibilidad del umbral de activación del reflejo barorreceptor y de la actividad del nervio simpático renal. El reflejo no quedaría propiamente inhibido sino que operaría en un rango de sensibilidad mucho más alto (Horiuchi y cols., 2006; McDowall y cols., 2006)

La desinhibición del Núcleo Dorsomedial Hipotalámico (DMH) tras la microinyección de bicuculina (antagonista de receptores GABA) produce un aumento en la actividad simpática renal y la presión arterial que ha sido atribuida a la activación de neuronas en el RVLM (Fontes y cols., 2001; Cao y cols., 2004). La administración de bicuculina también produce un aumento de la frecuencia cardíaca, que disminuye entre un 30-50% por la inhibición del Rafe Pálido con muscimol (Samuels y cols., 2002; Zaretsky y cols., 2003; Horiuchi y cols., 2004).

Además existen evidencias morfológicas de proyecciones desde el DMH hacia el Rafe Pálido (Samuels y cols., 2004). Los resultados

parecen demostrar que la respuesta cardiovascular presora y taquicardizante evocada desde esta región presentaría dos rutas descendentes, una responsable del aumento de presión arterial, vía RVLM, y otra responsable del aumento de frecuencia cardiaca, vía Rafe Pálido.

Actualmente se tiende a pensar que las distintas regiones del hipotálamo tienen funciones sutilmente diferentes en la organización de la reacción de defensa. La estimulación combinada de cuerpos celulares de distintos subnúcleos colabora para una perfecta integración de la respuesta de hipertensión, taquicardia, taquipnea y cambios autonómicos clásicamente descritos para la reacción de defensa.

1.3.3. Respuesta de defensa. Papel de la SGPdl

Como se ha descrito anteriormente, la SGPdl recibe conexiones desde regiones sensitivas que incluyen información de receptores visuales, auditivos y olfativos, en particular los que pueden informar de una amenaza externa. En consonancia con estas conexiones anatómicas, se ha demostrado que un estímulo auditivo (la aplicación de ultrasonidos), puede accionar el comportamiento defensivo en ratas (Beckett y cols., 1996), como demuestra el aumento de la expresión de c-Fos (un marcador de activación neuronal) en la SGPdl durante la respuesta de defensa (Klein y cols., 2010). Del mismo modo, el olor a gato (sólo entrada olfativa) o la exposición a un gato (entradas visuales, olfativas y auditivas) también provoca un aumento de la expresión de c-Fos en la SGPdl (y en menor medida en la SGPdm) a niveles rostrales e intermedios de la SGP, pero no en un grado significativo en la SGPI y SGPvl a estos niveles (Canteras y Goto, 1999; Dielenberg y cols, 2001; Motta y cols, 2009). Además, estos estímulos también evocan una fuerte expresión de c-Fos en el PMDvl que, como se ha mencionado anteriormente, posee una gran cantidad de conexiones directas con la SGPdl (Motta y cols., 2009).

En contraste, los estímulos que son esencialmente físicos, tales como el calor radiante o dolor muscular, evocan aumento de la expresión de c-Fos principalmente en la SGPI o vISGPvl con poco efecto en la SGPdl (Keay y Bandler, 2001). Por último, los estímulos que tienen componentes tanto físicos como psicológicos (soplo de aire) evocan la expresión de c-Fos en todas las subregiones de la SGP (Furlong y cols., 2009). En consonancia con los resultados descritos anteriormente (olor a gato o la exposición a un gato), las lesiones de la SGP dorsal que incluyen la SGPdl causan una reducción en la respuesta de comportamiento y en la respuesta taquicárdica a estos estímulos, pero no

tiene ningún efecto significativo sobre la respuesta presora (Dielenberg y cols., 2004). Por lo tanto, las neuronas en el SGPdl parecen contribuir a la expresión de algunos pero no todos los componentes de la respuesta cardiovascular y de comportamiento a estos estímulos amenazantes.

Otros estudios de comportamiento han demostrado que la activación de los cuerpos celulares, por microinyección de un aminoácido excitatorio, de las neuronas de SGPI y SGPdl en rata, evoca respuestas defensivas de comportamiento (por ejemplo, de parálisis y de huida), pero el umbral para tales efectos es significativamente menor en la SGPdl (Bittencourt y cols., 2004). Una respuesta de comportamiento similar también puede ser evocada desde capas profundas del colículo superior que recubre la SGPdl (Bittencourt y cols., 2005).

En ratas anestesiadas, la microinyección del aminoácido excitatorio ácido DL-homocistéico (DLH) en la SGPdl evoca cambios autonómicos y respiratorios que son apropiados para tales comportamientos, es decir, un notable incremento de la actividad nerviosa simpática renal (RSNA) y en la actividad respiratoria (Huang y cols., 2000; Subramanian y cols., 2008; Ligaya y cols., 2010).

Ligaya y cols., (2010) también encontró diferentes patrones de respuesta desde la SGPdl en comparación con la SGPdm y SGPI mediante la inyección de cantidades muy pequeñas de DLH (750 pmol en 15 nl). En particular, mientras que los grandes incrementos en la RSNA fueron evocados desde estas tres subregiones de la SGP, el aumento de la actividad respiratoria fue mucho mayor desde la SGPdl. Por otra parte, el aumento de la actividad respiratoria evocada desde la SGPdl se debió principalmente a un aumento en la frecuencia respiratoria, mientras que la evocada desde la SGPI se debió principalmente a un aumento en la

amplitud respiratoria (tal como se mide por las magnitudes de las ráfagas de actividad del nervio frénico).

Otra característica interesante de las respuestas evocadas desde la SGPdl es la estrecha correlación entre los aumentos evocados en RSNA y los aumentos evocados en la actividad respiratoria (Ligaya y cols., 2010). El hecho de que poderosas respuestas simpáticas respiratorias y renales puedan ser al mismo tiempo generadas desde la SGPdl es consistente con la opinión de que esta región genera respuestas de comportamiento de defensa, en las que los aumentos simultáneos en la actividad respiratoria y simpática son fisiológicamente ventajosos. No hubo correlación, sin embargo, entre el aumento de la frecuencia cardíaca y el aumento de la actividad respiratoria, lo que refleja el hecho de que los cambios en la frecuencia cardíaca provocada desde la SGPdl son pequeños y variables (Ligaya y cols., 2010). Como se ha mencionado anteriormente, sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que una alerta auditiva leve o estímulos visuales en ratas conscientes evocan un marcado aumento en la frecuencia respiratoria, pero tienen poco efecto sobre la frecuencia cardíaca (Kabir y cols., 2010).

Estas observaciones apoyan la idea de que los cambios respiratorios y cardíacos provocados por estímulos auditivos o visuales están regulados por vías separadas dentro del cerebro. Como se describió anteriormente, la SGPdl tiene una alta concentración de receptores de GABA y enzimas que sintetizan óxido nítrico, mucho mayor que en otras subregiones de la SGP. La alta concentración de receptores de GABA indica que las neuronas en la SGPdl están sujetas a entradas inhibitorias fuertes. En consonancia con esto, el bloqueo de los receptores de GABA en la SGPdl por microinyección de bicuculina evoca una fuerte respuesta simpática y respiratoria (Ligaya y cols., 2012), lo que indica que las neuronas en la SGPdl que generan estas respuestas reciben entradas

GABAérgicas tónicas. Del mismo modo, el bloqueo de la enzima óxido nítrico sintasa en la SGPdl evoca una respuesta presora (Hall y Behbehani, 1997), lo que indica que el óxido nítrico también tiene un efecto inhibidor tónico. Otro estudio utilizando registros de células completas demuestra que el mecanismo de este efecto se basa en la inhibición de la actividad neuronal en la SGPdl por el óxido nítrico a través de una potenciación de entradas sinápticas GABAérgicas (Xing y cols., 2008). Los estímulos fisiológicos que normalmente regulan la liberación de óxido nítrico en la SGPdl, así como las acciones sobre las neuronas GABAérgicas que no están mediadas por el óxido nítrico, sin embargo, siguen siendo desconocidos. Del mismo modo, no se ha determinado la fuente(s) de las entradas GABAérgicas a la SGPdl. También ha habido algunos estudios que proporcionan información sobre el papel de la SGP en el ser humano en la generación de cambios fisiológicos asociados con el estrés psicológico agudo. En particular, un ataque de pánico inducido por la administración de lactato en pacientes, conocido por estar asociado a un incremento significativo en la actividad simpática y respiratoria (Esler y Kaye, 2000; Sinha y cols., 2000), se ha demostrado que se asocia con un aumento del flujo sanguíneo a través del colículo superior y la región inmediatamente subyacente, que incluiría la SGPdl (Reiman y cols., 1989). En segundo lugar, un estudio de Mobbs y cols., (2007), utilizando imágenes de resonancia magnética funcional mostraron que la actividad en la SGPd se incrementaba en humanos enfrentados a un depredador virtual (mediante simulación por ordenador), y que esta actividad aumentaba con la proximidad de la amenaza.

Aunque el estudio de la resolución de estas imágenes cerebrales no fue suficiente para identificar con precisión las subregiones SGP que se activaban, sí demostró que la SGPdl tiene un papel fundamental en la integración de las respuestas al estrés psicológico agudo. En apoyo de esto, estudios recientes han demostrado que la estimulación de la parte

dorsal de la SGP en los seres humanos provoca aumentos en la presión arterial, presumiblemente debido a un aumento en la actividad simpática (Basnayake y cols., 2011, 2012).

1.4. Área A5

1.4.1. Aspectos generales del Área A5

El Área A5 es, por definición, un conjunto de neuronas catecolaminérgicas (noradrenérgicas) que forman una estrecha columna de células localizada en la zona ventrolateral de la formación reticular parvicelular dentro de la parte caudal de la protuberancia (Byrum y cols., 1984).

Se divide en tres regiones en función de su localización espacial: lateral, dorsal y caudal. La subdivisión lateral se encuentra distribuida dentro del tracto rubrospinal, lateral al complejo olivar superior y medial al complejo trigeminal sensorial. Se puede decir que esta subdivisión es la que presenta un mayor número de neuronas. La subdivisión dorsal es mucho más reducida en tamaño y se localiza en la zona superior del complejo olivar superior. La subdivisión caudal está formada por un número muy reducido de células y se encuentra lateral al polo rostral del núcleo motor del facial. Aunque la mayoría de las neuronas del Área A5 son catecolaminérgicas, entre ellas hay otras neuronas que no reúnen todas las características típicas de este tipo de neuronas (Jodkowski y cols., 1994 y 1997; Goodchild y Pilowsky, 2001).

El Área A5 fue descrita por primera vez en rata, en 1964, por Dahlström y Fuxe. En este animal parece estar bien delimitada, aunque no tanto como para que puedan establecerse unos márgenes nítidos con los otros grupos noradrenérgicos localizados en la protuberancia, el grupo A7 y la región subcoerulea (Byrum y cols., 1984). Otras especies como el gato, el conejo o el perro, presentan un Área A5 peor delimitada (Ishikawa y cols., 1975; Blessing y cols., 1981; Lackner, 1980). En el hombre su

localización es muy parecida a la de la rata y sus alteraciones parecen estar involucradas en algunas de las manifestaciones cardiorrespiratorias que se observan en algunas patologías como son: el Síndrome de Rett y el mal de Ondine que actualmente se engloban dentro de los factores etiológicos responsables del Síndrome de Muerte Súbita Infantil (Obonai y cols., 1998; Cann-Moisán y cols., 1999; Ozawa y cols., 1999, 2003; Julu y cols., 2001; Sasaki y cols., 2003; Horne y cols., 2004; Ribas-Salgueiro y cols., 2004; Gaultier y cols., 2004; Weese-Mayer y cols., 2004).

Las neuronas catecolaminérgicas del Área A5 presentan los mecanismos enzimáticos necesarios que caracterizan a las neuronas noradrenérgicas (Goodchild y Pilowsky, 2001), es decir, incluyen:

- Tirosina Hidroxilasa (TH)
- L-aminoácido aromático Descarboxilasa (aaDC)
- Dopamina Beta Hidroxilasa (D β OH).

Guyenet y cols., (2004) afirman que las neuronas del Área A5 carecen de marcadores de mRNA para la transmisión glutamatérgica, glicinérgica o gabaérgica.

Goodchild y Pilowsky (2001) identificaron una subpoblación de neuronas dentro del Área A5 que son inmunoreactivas para la D β OH pero no para las otras enzimas del ciclo (TH y aaDC). Estas neuronas se localizan en los niveles más caudales de la extensión del Área A5 (aproximadamente 600 micras rostrocaudalmente), mientras que las neuronas catecolaminérgicas típicas se extienden de 1.6 a 2.0 mm (Dahlström y Fuxe, 1964; Byrum 1984). Estos dos grupos celulares son distinguibles, además, en su forma celular. Las neuronas catecolaminérgicas típicas del Área A5 son de tamaño medio y, a menudo, multipolares, como describieron Dahlström y Fuxe en 1964. En

cambio, las neuronas del grupo no catecolaminérgico son más pequeñas, tienen el soma circular y, a menudo, son bipolares o tripolares.

Huangfu y Guyenet en 1997, corroborado por nuestro grupo de investigación (López-González y cols., 2013) describen otra característica de las neuronas catecolaminérgicas del Área A5; su actividad marcapasos. Las neuronas del Área A5 poseen actividad propia in vitro, es decir, son activas de manera espontánea en preparaciones de protuberancia en rodaja de animales neonatos. Esta actividad marcapasos es inhibida, tras la administración de noradrenalina, por autorreceptores presinápticos del tipo α_2 .

La gran mayoría de las neuronas del Área A5 presentan una frecuencia de descarga espontánea baja (entre 2 y 4 descargas por segundo). La actividad espontánea de la mayoría de las células del Área A5 parece deberse a propiedades intrínsecas más que a aferencias sinápticas. Esta actividad de autoexcitación se debe a oscilaciones irregulares subumbrales del potencial de membrana, producidas por cambios de conductancias activadas por voltaje por medio de corrientes de sodio tetrodotoxin-sensibles. Otra característica es que la actividad espontánea cesa o disminuye ante aumentos de presión arterial. La forma más utilizada de caracterización consiste en producir una respuesta presora por medio de la administración intravenosa de clonidina a dosis bajas. Se sabe también que presentan una velocidad de conducción característica de neuronas con poca o ninguna mielinización (2-3 ms), es decir, son fibras C. Todas estas características son muy similares a las neuronas C1 simpatoexcitadoras de la RVLM.

1.4.2. Aspectos morfofuncionales del Área A5

Se han estudiado en detalle las conexiones del Área A5 con otras zonas del sistema nervioso central. El Área A5 presenta conexiones aferentes y eferentes con distintos núcleos a nivel mesencefálico, protuberancial y bulbar.

1.4.2.1. Conexiones aferentes

El primer trabajo que describe las conexiones aferentes al Área A5 fue el de Woodruff, Baisden, Whittington y Kelly en 1986. En este estudio realizado en conejo establecen por primera vez, mediante la técnica de trazadores con peroxidasa de rábano conjugada con aglutinina de germen de trigo, qué zonas concretas proyectan conexiones al Área A5. Entre estas zonas destacan los siguientes núcleos: el Núcleo del Tracto Solitario (NTS), la formación reticular bulbar, el locus coeruleus (LC), el Rafe Magno, el complejo Parabraquial (cPB), el Núcleo Paraventricular Hipotalámico (nPVH) y las regiones Lateral y Perifornical del hipotálamo.

Posteriormente, Byrum y Guyenet en 1987 publican el trabajo más completo realizado hasta ahora sobre las conexiones tanto aferentes como eferentes de esta zona. La técnica usada para describir las conexiones que proyectan hacia y desde el Área A5 es la misma que usaron los autores anteriores (Woodruff y cols., 1986), peroxidasa de rábano conjugada con aglutinina de germen de trigo para el marcaje retrógrado (microinyección en el Área A5 y transporte anterógrado hacia los somas desde los terminales eferentes que hacen sinapsis en neuronas del Área A5). De esta forma confirman y amplían las conexiones aferentes del Área A5 que habían sido descritas previamente. En el Área A5 convergen aferencias desde el núcleo Paraventricular Hipotalámico (nPVH), región Lateral (LH), núcleo Dorsomedial Hipotalámico (DMH),

región Perifornical del Hipotálamo (PFH), Zona Incerta (ZI), Sustancia Gris Periacueductal (SGP), complejo Parabraquial (cPB), Locus Coeruleus (LC), núcleo Sensorial Principal del Trigémino (PrV), complejo Trigeminal Espinal (SpV), complejo Vestibular (VC), zonas intermedia y caudal del núcleo del Tracto Solitario (NTS), zona caudal ventral de la Formación Reticular (RF), Rafe Oscuro, línea media dorsal del bulbo y zona contralateral protuberancial de la formación reticular parvicelular.

Evidentemente, unas zonas proyectan con más densidad que otras. Destacan por su densidad las profusas proyecciones desde las zonas intermedia y caudal del NTS, del complejo Parabraquial (principalmente desde la región lateral (IPB) y Kölliker-Fuse (KF) y con menor intensidad de la región medial), de la región Perifornical Hipotalámica (PFH) y del núcleo Paraventricular Hipotalámico (nPvH) (en mayor medida de la parte posterior de la subdivisión lateral parvicelular). Todas estas zonas están involucradas en el control cardiorrespiratorio. Esta relación morfológica parece corroborar el posible rol del Área A5 en el control y la modulación de la actividad central cardiorrespiratoria. El resto de zonas que envían proyecciones al Área A5 lo hacen de forma difusa o débil siendo, por tanto, su influencia mucho menor.

Estudios posteriores han completado la lista de conexiones aferentes al Área A5. Caben destacar las conexiones desde la Sustancia Gris Periacueductal ventrolateral (SGPvl) (Bajic y Proudfit, 1999, 2012), desde las neuronas de la Lamina I de la médula espinal (Westlund y Craig, 1996); desde el bulbo, más concretamente desde el Bulbo Caudal Ventrolateral (CVLM) (Tavares y cols., 1996 y 1997; Cobos y cols., 2003) y desde las neuronas C1 del Bulbo Rostral Ventrolateral (RVLM) (Card y cols., 2006; Abbot y cols., 2012) y desde una nueva región descrita hace muy poco tiempo llamada Área Presora Caudal del Bulbo Caudal Ventrolateral (CPA) (Sun y Panneton, 2002, 2005, 2006; Natarajan y

Morrison, 2000; Horiuchi y Dampney, 2002). Tanto la Lámina I como la región del Bulbo Caudal Ventrolateral tienen un papel preponderante en la integración de respuestas nociceptivas lo que añade un nuevo papel a la funcionalidad del Área A5. También se han descrito conexiones aferentes desde el Núcleo Retrotrapezoidal (Rosin y cols., 2006) y desde el Grupo Respiratorio Ventral (Dobbins y Feldman, 1994; Gaytan y cols., 1997, 2002). Así como aferencias trigeminales desde la cavidad nasal (Caous y cols., 2001; Panneton y cols., 2000).

1.4.2.2. Conexiones eferentes

Los estudios de Byrum y Guyenet en 1987 demuestran que, al menos, el 92% de las neuronas noradrenérgicas del Área A5 proyectan sus axones a la médula espinal, principalmente a las neuronas preganglionares simpáticas de la columna Intermedio Lateral de la médula espinal (cIML). Concretamente a la lámina X y al área autónoma central. Esta proyección al cIML confirma definitivamente lo que ya se había descrito anteriormente por Blessing y cols., 1981; Westlund y cols., 1984; Byrum y cols., 1984; Loewy y cols., 1979, 1986 y posteriormente por Strack y cols., 1989; Kwiat y Basbaum, 1990; Huangfu y cols., 1991; Clark y Proudfit, 1993; Bajic y Proudfit, 1999; Bruinstroop y cols., 2011.

Clark y Proudfit en 1993 demuestran que esta proyección espinal viaja por el funículo dorsolateral hacia los segmentos cervical, torácico y lumbar de la cIML, y que sus axones además de terminar en la lámina X, también lo hacen ipsilateralmente en las láminas IV, V y VI del asta dorsal y la lámina VII de la zona intermedia. Este dato añade a la conocida función cardiorrespiratoria del Área A5 una posible participación en la modulación nociceptiva, corroborando el trabajo realizado anteriormente por Burnett y Gebhart en 1991. Otros trabajos que confirman esta posibilidad son los del grupo de Tavares, Lima, Cobos y Teixeira (1996,

1997, 2002, 2003) que demuestran la existencia de conexiones recíprocas desde el Área A5 hacia una zona lateral del Bulbo Caudal Ventrolateral (VLMlat) y las conexiones recíprocas de ambas zonas con la Lámina I y, por tanto, su posible rol en la modulación nociceptiva.

Con respecto a las neuronas descritas por Goodchild y Pilowsky (2001) que son inmunoreactivas a D β H pero no a TH y aaDC, no se conocen cuáles son sus proyecciones específicas, pero se sabe que no lo hacen ni a la RVLM ni a otros núcleos de la médula espinal como la columna intermediolateral (cIML). Se han descrito algunas conexiones desde el Área A5 al grupo respiratorio ventral usando las mismas técnicas descritas anteriormente (Smith y cols., 1988; Nuñez-Abades cols., 1993).

Además de la densa proyección a las neuronas preganglionares simpáticas (92%), Byrum y Guyenet, 1987 describen conexiones hacia importantes núcleos de regiones mesencefálicas, protuberanciales y bulbares.

Destacan las conexiones eferentes a la zona bulbar, concretamente a la mitad caudal del NTS y al núcleo Dorsal Motor del Vago, ambos de manera bilateral. Demuestran también que la innervación es completamente noradrenérgica y, además, que más de la mitad de las neuronas del Área A5 proyectan ipsilateralmente a ambos núcleos, incluso en algunos casos de manera bilateral. Otra proyección eferente muy importante es la que existe con la región del complejo Parabraquial. Más concretamente hacia el núcleo Parabraquial Lateral (IPB) y al núcleo Kölliker-Fuse (KF). También existen importantes conexiones con la zona mesencefálica a nivel de la Sustancia Gris Periacueductal ventral y lateral.

Si seguimos la línea ascendente, este estudio muestra que, al menos, la tercera parte de las neuronas del Área A5 proyectan

bilateralmente al Hipotálamo o a regiones superiores, con una proporción bastante alta de conexiones que continúan hasta niveles tuberales. En el hipotálamo, una quinta parte de las neuronas del Área A5 proyectan a la Región Perifornical de manera bilateral. Esta zona parece ser una de las zonas diana de los axones de las neuronas del Área A5 junto con el núcleo Paraventricular Hipotalámico.

También se observan conexiones con el Núcleo Dorsomedial Hipotalámico y el núcleo Paraventricular del Tálamo. Otra región eferente diana para las neuronas del Área A5 parece ser el núcleo Central de la Amígdala (esta proyección se recoge también en el estudio de Usunoff y cols., 2006) ya que, al menos, la quinta parte de las neuronas del Área A5 proyectan de manera bilateral a la zona, junto a ella también presenta conexiones con el núcleo del lecho de la estría terminal.

En trabajos más actuales, Bruinstroop y cols., 2012, se han vuelto a visitar, describir y actualizar las conexiones eferentes del Área A5 hacia la zona dorsal y ventral de la médula espinal, a nivel cervical y lumbosacro (dispersas) y de la columna intermediolateral torácica (más densas), sobre todo a nivel de las neuronas preganglionares simpáticas. También se han descrito conexiones eferentes desde el Área A5 al núcleo Retrotrapezoidal (RTN) (Rosin y cols., 2006), donde actualmente se supone que se ubican quimiorreceptores centrales (Nattie y Li, 2006). En otro trabajo, Kubin y Rukhadze (2007) han descrito que el núcleo Motor del Hipogloso y el núcleo viscerosensorial del Núcleo del Tracto Solitario reciben conexiones eferentes desde el Área A5 en una proporción de un 46% y 43 % respectivamente, del total de las proyecciones catecolaminérgicas que reciben, indicando esto que el Área A5 puede jugar un papel importante en la modulación del flujo motor y de la transmisión viscerosensorial.

En resumen, el Área A5 catecolaminérgica pontina proyecta de una manera muy amplia a muchas estructuras del sistema nervioso central subcortical implicadas en la modulación autónoma. Todo este entramado de conexiones permite establecer claramente el posible rol de esta región tanto en el control cardiorrespiratorio como en su posible papel en la modulación nociceptiva.

1.4.3. Función del Área A5 en el control cardiorrespiratorio

1.4.3.1. Papel del Área A5 en el control cardiovascular

Históricamente ha habido una gran controversia acerca del posible papel en la regulación cardiovascular del Área A5. Los diferentes autores se han decantado por dos funciones completamente antagónicas: función simpatoexcitadora o función simpatoinhibidora. En algunos casos se han producido circunstancias dicotómicas, ya que la estimulación química ha provocado disminución de presión arterial y bradicardia, por lo que hablaríamos de simpatoinhibición (Neil, 1982; Close, 1982); mientras que la estimulación eléctrica ha sido simpatoexcitadora (aunque hay casos en los que incluso ha resultado cardioinhibidora, como en el caso de Drye, 1990).

En estudios más recientes, los autores se decantan principalmente por la actividad simpatoexcitadora de la zona, ya que la estimulación eléctrica (Close, 1982; Loewy, 1979; Neil, 1982) y química (glutamato) del Área A5 se caracteriza por un incremento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Dawid-Milner MS y cols., 2001; Dawid-Milner MS y cols., 2003) asociado a una respuesta de facilitación espiratoria con bradipnea y aumento de la presión subglótica (Lara JP y cols., 2002). Además, la respuesta a la microestimulación química con glutamato es muy similar a la producida en el núcleo Parabraquial medial tras la estimulación con el mismo neurotransmisor. Sugiriendo, por tanto, una posible relación funcional entre ambos. La microestimulación química de los somas del Área A5 produce también un aumento de la actividad nerviosa simpática renal y esplácnica. Este efecto es abolido por la destrucción selectiva de células catecolaminérgicas del Área A5 producido por la microinyección de 6-OHDA (Huangfu 1991, 1992;

Koshiya y Guyenet, 1994). El Área A5, su estimulación, también modifica la lagrimación y la salivación (Toth y cols., 1999).

Los registros neuronales unitarios realizados en las células putativas de esta región pontina confirman el papel simpatoexcitador de estas neuronas (Huangfu y cols., 1991; Guyenet y cols., 1993; Koshiya y Guyenet 1994; López-González y cols., 2013). En estos estudios se observa que la actividad de las neuronas del Área A5 está fuertemente influenciada por inputs aferentes de control cardiorrespiratorio, como el que llega desde los barorreceptores arteriales y los provenientes de los quimiorreceptores periféricos, así como desde el Área de Defensa Hipotalámica.

Las neuronas del Área A5 correlacionan su descarga con la descarga simpática. La descarga del nervio espláncnico simpático se precede por un potencial de acción de las neuronas del Área A5 en unos 69 ms (Koshiya y Guyenet, 1994). Este dato es otra prueba a favor del papel simpatoexcitador de este grupo neuronal.

El 63% de las neuronas registradas son inhibidas por el aumento de presión arterial concomitante a la inyección de adrenalina o al estímulo barorreceptor por constricción aórtica. Independientemente del modelo de activación barorreceptora, la inhibición se produce en un rango de presión arterial que abarca desde los 80 a los 140 mmHg.

Asimismo, durante la disminución de presión arterial evocada por la estimulación del reflejo Von Bezold-Jarisch, en el cual se provoca la activación de receptores cardiopulmonares mediante la administración intravenosa de fenilbiguanida (agonista serotoninérgico), se produce una disminución de la descarga nerviosa simpática. Acompañando a esta disminución de la actividad nerviosa espláncnica, las neuronas del Área

A5 noradrenérgicas responden con un aumento brusco de su descarga, confirmando así su rol simpatoexcitador.

Las neuronas del Área A5 juegan un papel importante en el aumento de la presión arterial evocado por la estimulación de los quimiorreceptores. Durante breves periodos de anoxia (10 s) o hipoxia (aplicando O₂ al 12%) aumentan su frecuencia de descarga basal al mismo tiempo que la presión arterial y la actividad del nervio frénico. Este efecto no se observa en ratas en las que se han bloqueado los quimiorreceptores carotídeos. El mismo resultado aparece en animales durante hipercapnia (5-8% de CO₂). El aumento de CO₂ incrementa significativamente la actividad de las neuronas del Área A5 en animales con los quimiorreceptores periféricos intactos. La respuesta desaparece cuando se denervan estos quimiorreceptores. Otro dato que confirma el importante papel de estas neuronas en el reflejo quimiorreceptor es que la microinyección de muscimol (agonista gabaérgico) en el Área A5 disminuye hasta en un 85% la magnitud de este reflejo sin variar otras variables cardiorrespiratorias. Toda esta serie de datos nos permiten concluir que las neuronas del Área A5 poseen una función claramente simpatoexcitadora.

En las últimas revisiones realizadas sobre el control simpático del sistema cardiovascular y de los mecanismos de integración de los reflejos barorreceptor y quimiorreceptor y de las vías centrales que los soportan tanto en animales conscientes (Dampney y Horiuchi, 2003; Dampney y cols., 2003) como anestesiados (Pilowsky y Goodchild, 2002; Guyenet, 2006; Kanbar y cols., 2011; López-González y cols., 2013), los distintos autores coinciden en otorgar un papel relevante al Área A5 en el control simpatoexcitador.

Concretamente, en uno de los últimos trabajos publicados por nuestro grupo de investigación (López-González MV y cols., 2013), se pone de manifiesto esta actividad simpatoexcitadora al demostrarse la participación del Área A5 en la respuesta de defensa evocada desde el Área de Defensa Hipotalámica. En este trabajo nuestro grupo demuestra, por primera vez, mediante técnicas electrofisiológicas, neuroanatómicas y neurofarmacológicas la existencia de conexiones funcionales entre las dos zonas. Parece ser que el Área A5 es funcionalmente necesaria para que se produzcan los cambios autonómicos necesarios, entre ellos la inhibición del reflejo baroreceptor, durante la activación de la respuesta de defensa desde esta zona. Sin esta inhibición, no se podría obtener el aumento de frecuencia cardíaca y presión arterial necesarios para el correcto desarrollo de la respuesta de defensa del animal. Se sugiere que esta participación del Área A5 en la respuesta de defensa está mediada por las conexiones aferentes desde el Área de Defensa Hipotalámica y desde el Complejo Parabraquial hacia este núcleo, y las propias eferentes del Área A5 hasta las zonas bulbares y espinales implicadas en esta respuesta. Éstas serían las que posee con el Bulbo rostroventrolateral y caudoventrolateral y el Núcleo del Tracto Solitario y con la columna intermediolateral medular.

1.4.3.2. Papel del Área A5 en el control respiratorio

Hay pocos estudios que hayan intentado dilucidar la función respiratoria del Área A5. Siempre que se ha estudiado la zona de la protuberancia ventrolateral ha sido de forma superficial y la mayoría de las veces como complemento al estudio de la actividad cardiovascular.

Si echamos la vista atrás en el tiempo, ya en el año 1923, Lumsden y cols. hacían referencia al posible papel de la protuberancia en el control respiratorio utilizando técnicas de transección nerviosa bulbo-

protuberancial. En un estudio que se ha convertido en un clásico, este autor demostró que existían ciertas estructuras pontinas, llamadas centros pneumotáxicos, que estaban implicados en el mantenimiento del patrón respiratorio normal en gatos adultos anestesiados y vagotomizados. Es más, la transección protuberancial media, eliminando eferencias de la protuberancia rostral, producía un patrón concreto llamado “apneústico”, caracterizado por inspiraciones largas y sostenidas interrumpidas por espiraciones cortas.

Este patrón no sólo requería la ausencia de determinadas estructuras pontinas sino también vagotomía y anestesia. (Stella, 1938; St John y cols., 1972). Estimulaciones eléctricas, lesiones electrolíticas y registros neuronales han localizado los centros pneumotáxicos clásicamente en el núcleo Parabraquial Medial y en el núcleo Kölliker-Fuse (Bertrand y cols., 1971, 1973, 1974; Vibert y cols., 1976). Además, se sabe que las neuronas con control respiratorio de esos núcleos ejercen su función por medio de glutamato actuando en receptores NMDA de células diana ya que se puede producir apneusis bloqueando estos receptores (Foutz y cols., 1988; Borday y cols., 1998).

En 1973 Bolme y Fuxe, al producir apneusis inhibiendo el Locus Coeruleus, introdujeron la posibilidad de que fueran las neuronas centrales noradrenérgicas las que pudieran producir este tipo de patrón respiratorio derivado del centro pneumotáxico. Incluso se ha hipotetizado a lo largo de los años con la posibilidad de que en realidad estos centros no existan en la rata ya que las dosis de antagonistas de NMDA que se debían usar no eran ni mucho menos comparables con aquéllas que eran eficientes en gatos (Monteau y cols., 1990). Recientemente se ha contemplado la posibilidad de que haya otros centros nerviosos implicados. Las lesiones químicas producidas en regiones de la protuberancia ventrolateral, incluyendo el Área A5, inducen un patrón de

respiración apneústica en ratas adultas anestesiadas, vagotomizadas, paralizadas y ventiladas artificialmente (Wang y cols., 1993; Jodkowsky y cols., 1994; Coles y Dick, 1996).

El conocimiento de estos resultados lleva a profundizar en el estudio del papel del Área A5 en la regulación respiratoria. Los primeros trabajos comprobaron que una estimulación amplia con glutamato de la protuberancia ventrolateral, incluyendo el Área A5, prolonga la espiración (Jodkowsky y cols., 1997). Se describen también varios grados de apnea tras la estimulación eléctrica del Área A5 (Loewy y cols., 1979). Además, se ha intentado ver el posible papel de esta zona con estudios “in vitro” en rodajas de protuberancia en preparaciones neonatales (Hilaire y cols., 1989, 1993, 2004).

Hilaire y cols., 1989, observan que, *in vitro*, en preparaciones pontino-bulbares neonatales de rata, lesiones electrolíticas locales del Área A5 activan al generador del ritmo respiratorio a nivel bulbar, aumentando la frecuencia de descarga frénica. Por otro lado, las estimulaciones eléctricas del Área A5 lo inhibían disminuyendo la frecuencia respiratoria por aumento del tiempo espiratorio.

La confirmación definitiva del papel del Área A5 en el control cardiorrespiratorio lo realiza nuestro grupo en el año 2001 (Dawid-Milner y cols., 2001). Los resultados del estudio de Dawid-Milner y cols., 2001, indican que la respuesta respiratoria a la activación específica de los somas del Área A5 mediante la microinyección de glutamato, consiste principalmente en una disminución de la frecuencia respiratoria debido a una disminución del tiempo espiratorio.

Este dato sugiere que la respuesta respiratoria que se produce con la microinyección de glutamato puede atribuirse a la activación de somas

en el Área A5. Sin embargo, es conocido que todo aumento de presión arterial provoca, por vía refleja, una disminución concomitante de la frecuencia respiratoria. Para dilucidar el papel real de las neuronas del Área A5, los mismos autores ponen de manifiesto que la estimulación eléctrica y con glutamato de las neuronas del Área A5 tras el bloqueo de la respuesta presora mediante la administración de guanetidina sigue produciendo una disminución de la frecuencia respiratoria y de la actividad frénica en animales anestesiados, paralizados y ventilados artificialmente. Este parece ser el patrón de respuesta real de las neuronas del Área A5 cuando son activadas directamente y cuando se excluyen los principales reflejos cardiorrespiratorios.

Trabajos posteriores en ratones (Viemari y cols., 2003, 2004) repiten las técnicas usadas anteriormente y añaden la aplicación de agonistas noradrenérgicos al generador del ritmo respiratorio, obteniendo también una disminución de la frecuencia respiratoria. Es decir, confirman que el bloqueo mediante lesión electrolítica del Área A5 activa al generador del ritmo respiratorio mientras que la aplicación de agonistas noradrenérgicos lo inhiben, poniendo de manifiesto que las neuronas del Área A5 son las responsables de la inhibición noradrenérgica que recibe el generador del ritmo respiratorio a nivel bulbar, mediante receptores α_2 noradrenérgicos (Errchidi y cols., 1990, 1991; Viemari y cols., 2003; Hilaire y cols., 2004), aunque esta inhibición no es lo suficientemente fuerte, en rata, para eliminar la ritmogénesis respiratoria, cosa que sí ocurre en los ratones.

El posible papel del Área A5 en el control respiratorio se deriva también de trabajos morfológicos en rata adulta mediante la microinyección de virus trans-sinápticos en motoneuronas frénicas. En estos trabajos se comprueba que en el Área A5 existen neuronas de tercer orden implicadas en la red neuronal que controla la actividad

diafragmática y, por tanto, la fonación y la respiración (Dobbins y Feldman, 1994).

Además, las neuronas del Área A5 presentan un perfil de descarga respiratorio y, en su mayoría, poseen actividad postinspiratoria (Guyenet y cols., 1993). Participan también en las respuestas respiratorias a hipoxia y a hipercapnia (Guyenet y cols., 1993; Coles y Dick, 1996; Haxhiu y cols., 1996; Dick y Coles, 2000; Roux y cols., 2000; Schlenker y Prestbo, 2003). Cuando se retira el estímulo hipóxico, la frecuencia respiratoria disminuye por debajo de niveles basales. A este fenómeno se le llama “disminución de frecuencia respiratoria posthipóxica” y está asociado con un aumento del tiempo espiratorio.

Coles y Dick en 1996 describen por primera vez que las lesiones electrolíticas del Área A5 abolen la aparición de la “disminución de frecuencia respiratoria posthipóxica”. Obtienen también una respuesta similar tras la microinyección de muscimol (agonista gabaérgico) en el Área A5. Los mismos autores, en 1998, especifican que la disminución de la frecuencia respiratoria se produce por la activación de neuronas espiratorias del tronco del encéfalo y que la neurotransmisión glutamatérgica a nivel del Área A5 estaría involucrada en la modulación de la “disminución de frecuencia respiratoria posthipóxica”. En un trabajo reciente, Schlenker y Prestbo, 2003 lesionan el Área A5 y someten a los animales a hipoxia y a hipercapnia ratificando que la lesión del Área A5 elimina la “disminución de frecuencia respiratoria posthipóxica” y que también disminuye la respuesta respiratoria a la hipercapnia.

Actualmente, muchos autores centran sus esfuerzos en dilucidar el papel que juegan las regiones noradrenérgicas del tronco del encéfalo, entre ellas está el Área A5, y del bulbo espinal en la maduración del “Generador Central Respiratorio” (GCR) y en la modulación de su

actividad. El GCR ha sido estudiado en preparaciones “in vitro” de médula espinal y tronco del encéfalo de embriones de ratas y ratones y en recién nacidos. Estas preparaciones siguen manteniendo la ritmicidad del GCR durante varias horas (Di Pasquale y cols., 1992; Hilaire y cols., 1997; Viemari y cols., 2003). En preparaciones en rodaja del bulbo de neonatos y roedores jóvenes el GCR también mantiene su función, como lo demuestra el registro unitario de neuronas respiratorias del Grupo Respiratorio Ventral (GRV) (Koshiya y cols., 1999).

El “Generador Central del Ritmo Respiratorio” se localiza en el complejo pre-Botzinger, como se demuestra por medio de lesiones locales electrolíticas “in vitro” en las que se altera esta ritmicidad (Viemari y cols., 2003) o en preparaciones “in vivo” en mamíferos adultos en los que se observa una alteración del patrón respiratorio (Wenninger y cols., 2004; McKay y cols., 2005).

Hilaire, 2006, demuestra que los grupos noradrenérgicos del tronco del encéfalo intervienen en el control respiratorio, puesto que: 1) La noradrenalina endógena que liberan los cuatro grupos noradrenérgicos del tronco del encéfalo facilitan (A1/C1 y A6) o reducen (Área A5) la actividad del Generador Central del Ritmo Respiratorio. 2) Las Áreas A5 y A6 ejercen un efecto dual antagónico a nivel bulbar, el Área A5 tiene un efecto inhibitorio sobre el ritmo respiratorio mediante la activación de receptores α_2 , mientras que el Área A6 tiene un efecto acelerador del ritmo mediante la activación de receptores α_1 . 3) El Área A5 protuberancial y el grupo A1/C1 bulbar ejercen sus efectos antagónicos sobre el Generador Central del Ritmo Respiratorio mediante la activación de receptores α_2 . Aunque no se sabe si existen dos tipos funcionalmente diferentes de receptores α_2 . 4) El grupo A2/C2 bulbar puede tener un papel normalizador sobre el Generador Central del Ritmo Respiratorio a

través de mecanismos y de receptores que todavía no están totalmente definidos.

Todos estos datos sugieren que las neuronas del Área A5 establecen un control modulador bidireccional con neuronas centrales respiratorias y, por tanto, tienen un papel importante en el control respiratorio en diferentes situaciones fisiológicas.

1.4.4. Otras funciones del Área A5. Control nociceptivo

El trabajo de Clark y Proudfit en 1993, añade la función moduladora de la nocicepción a las comúnmente conocidas del Área A5. Estos autores comprueban que las neuronas noradrenérgicas del Área A5 proyectan sus axones a través del funículo dorsolateral a los segmentos cervical, torácico y lumbar. Sus axones terminan principalmente en la parte ipsilateral del asta dorsal (láminas IV-VI) y en la zona intermedia (lámina VII) además de la ya conocida proyección a la columna celular intermedio lateral, corroborando el trabajo realizado anteriormente por Burnett y Gebhart en 1991.

También se sabe que las neuronas del Área A5 participan en las respuestas autonómicas cardiorrespiratorias inducidas por la activación de inputs nasales trigeminales nociceptivos en mamíferos adultos (Allen y Pronych, 1997; McCulloch y Panneton, 1997; Esser y cols., 1998; McCulloch y cols., 1999; Panneton y cols., 2000).

En trabajos realizados por el grupo de Tavares, Lima, Cobos y Teixeira (1996, 1997, 2002, 2003), estos autores demuestran la existencia de conexiones recíprocas desde el Área A5 hacia una zona lateral del bulbo caudal ventrolateral (VLMlat) y las conexiones recíprocas de ambas zonas con la Lámina I. Además, demuestran que existen contactos sinápticos entre las zonas señaladas y que éstos presentan un carácter excitador. Es más, demuestran que la inhibición nociceptiva producida por receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos desde el bulbo caudal ventrolateral es específica de las regiones más laterales y está mediada por las neuronas noradrenérgicas del Área A5 (Burnett y Gebhart, 1991; Proudfit, 1988).

La mayoría de las neuronas noradrenérgicas que participan en esta vía disináptica hacia la médula espinal también presentan proyecciones

colaterales a la zona lateral del bulbo caudal ventrolateral (Tavares y cols., 1997). Como la noradrenalina y la clonidina inhiben a las neuronas de esta región bulbar produciendo hiperalgesia, es posible que la conexión entre esta zona y el Área A5 sea el sustrato anatómico para un circuito de feedback negativo que medie la inhibición del bulbo lateral ventrolateral disminuyendo la sensibilidad al dolor.

Otros autores (Westlund y Craig, 1996; Wilson y cols., 2002) añaden que el Área A5 y la CVLMlat pueden ser importantes en la homeostasis.

Por tanto, se puede decir que las neuronas de la zona caudal del bulbo ventrolateral poseen dos funciones: la primera, vasodepresora, ejercida a través de proyecciones inhibitorias al bulbo rostral ventrolateral, y una segunda función antinociceptiva que realizan a través de la ruta espinal noradrenérgica establecida con el Área A5. La primera ruta parece ser inhibitoria y la segunda parece ser excitadora, por lo que podrían ser realizadas por grupos de neuronas diferentes.

Otros datos que confirman el posible papel del Área A5 en el control nociceptivo son los de Cucchiari y Commons, (2003) en los que demuestran que las neuronas del Área A5 poseen el receptor de acetilcolina ($\alpha 4\beta 2$) el cual está implicado en los efectos analgésicos de derivados de la epibatidina como son el A-85380 y el ABT-594. Se comprobó que la subunidad $\alpha 4$ es la realmente importante a la hora de modular la acción analgésica de estas sustancias. Estos autores demuestran que la administración sistémica de epibatidina aumenta de manera muy significativa la expresión de c-Fos en las neuronas del Área A5 (además de en otros núcleos implicados en nocicepción), lo que indica que los efectos analgésicos de esta sustancia pueden estar mediados por su acción sobre la subunidad $\alpha 4$ en estos núcleos.

En trabajos actuales, Bajic y Proudfit, 2012, demuestran una conexión anatómica monosináptica entre la SGPvl y las neuronas del Área A5 (tanto las noradrenérgicas como las que no lo son). Se describen 3 acciones principales sobre esta zona: 1) conexiones excitadoras postsinápticas, sobre neuronas de la zona rostral del Área A5 que incluirían glutamato y sustancia P como neurotransmisores, 2) conexiones inhibitoras postsinápticas, sobre neuronas de las zonas rostral y caudal del área A5, mediante los neurotransmisores GABA y encefalina, que actuarían tanto en interneuronas como en neuronas propias de la zona y 3) Una acción inhibitora a nivel presináptico, sobre terminales neuronales excitadores que llegan al Área A5, sobre todo que contactan con neuronas no catecolaminérgicas, desde otras regiones. Por tanto, sería una función moduladora de la excitabilidad de esta zona.

La estimulación tanto eléctrica (Fang and Proudfit, 1996, 1998) como química (Yaksh, 1979; Jensen and Yaksh, 1984, 1986) de la SGPvl produce una potente simpatoinhibición y antinocicepción. Se sabe que esta función antinociceptiva es mediada, en su mayor parte, por neuronas noradrenérgicas que proyectan al asta dorsal de la médula espinal, donde entran en contacto con los inputs nociceptivos. Por tanto, los autores piensan que esta conexión monosináptica entre ambas áreas es básica para la función antinociceptiva, corroborando por tanto los estudios anteriormente citados.

1.4.5. Aspectos Fisiopatológicos del Área A5

Se ha analizado la cascada de genes que participan en la diferenciación de las neuronas noradrenérgicas del Área A5 durante el desarrollo del sistema nervioso central. Los genes más estudiados son: Rnx, Phox2a, Phox2b y Ret. Se sabe que mutaciones de alguno de ellos en ratones, no permiten un desarrollo del animal más allá de P1-P2. El corto periodo de vida de estos ratones se produce por una disfunción respiratoria fatal por déficit del efecto de la noradrenalina endógena sobre la maduración prenatal del Generador Central Respiratorio (GCR) (Blanchi y Sieweke, 2005).

Los estudios respiratorios “in vivo” de ratones mutantes para estos genes y los análisis “in vitro” de la actividad del GCR revelan que es necesario el desarrollo correcto de los grupos noradrenérgicos troncoencefálicos para una actividad respiratoria normal y, por tanto, para la supervivencia del animal.

Las alteraciones genéticas o epigenéticas de la maduración del sistema noradrenérgico durante el periodo perinatal pueden afectar a la maduración del GCR y, por tanto, tener drásticas consecuencias en la supervivencia postnatal. De hecho, el Síndrome de Muerte Súbita Infantil que es la causa principal de muerte en bebés de países industrializados, puede ser debido a desórdenes neurovegetativos, sobretudo a disfunciones cardiorrespiratorias durante el sueño (Horne y cols., 2004; Ribas-Salgueiro y cols., 2004). En el análisis postmortem de las víctimas de este síndrome se observa que, habitualmente, existen alteraciones en el sistema noradrenérgico en el tronco del encéfalo, con niveles anormales de metabolitos noradrenérgicos, morfología anormal de las neuronas noradrenérgicas y expresión anormal de receptores adrenales α_2 y expresión anormal de enzimas catecolaminérgicos (Obonai y cols.,

1998; Cann-Moisan y cols., 1999; Ozawa y cols., 1999, 2003) y presentan frecuentes mutaciones en genes implicados en la especificación del fenotipo noradrenérgico en genes tales como Phox2a, Ret y Rnx (Weese-Mayer y cols., 2004).

Existe otra enfermedad, el Síndrome de Hipoventilación Central Congénita (mal de Ondine) que es un desorden muy raro caracterizado por un fallo idiopático del control autonómico respiratorio (Sasaki y cols., 2003; Gaultier y cols., 2004). En estos pacientes se ha hallado la mutación heterocigota para el gen Phox2b, que induciría déficits en el sistema noradrenérgico. Estos síndromes junto a las apneas centrales o las apneas obstructivas del sueño pueden inducir una hipoxia crónica.

Otros estudios actuales se han centrado en el posible papel de los factores de crecimiento, más concretamente BDNF y GDNF, en el desarrollo de la red neuronal del tronco del encéfalo responsable de la función respiratoria. Estos estudios han identificado al Área A5 como una posible diana de estos factores (Katz, 2003 y 2005; Guo y cols., 2005; Huang y cols., 2005). De manera específica se sabe que ratones Knockout null para los genes de BDNF y GDNF pierden el 44% y el 37% de las neuronas TH en el Área A5 respectivamente. También se ha visto en cultivos de células del Área A5 que BDNF y DNF exógenos aumentan las ramificaciones de las neuronas TH del Área A5 sin afectar al número de neuronas o la proliferación de las células TH, sugiriendo que estos factores son vitales en la proliferación más que en la supervivencia de las neuronas del Área A5 y que pueden actuar como cofactor uno del otro regulando esta diferenciación.

Si tomamos en conjunto todos estos datos podemos afirmar que el Área A5 es un lugar donde una disrupción de las señales de BDNF y GDNF pueden desordenar el desarrollo de los inputs que manda al

generador del patrón respiratorio bulbar, por lo que tendría unas potenciales implicaciones clínicas ya que la posibilidad de una malformación en este desarrollo noradrenérgico a nivel protuberancial podría contribuir a los fenotipos respiratorios asociados con mutaciones en GDNF o en su receptor RET, como en los casos del Síndrome de Hipoventilación Central Congénita (mal de Ondine) en humanos (Sasaki y cols., 2003). De manera similar el Área A5 podría estar implicada en el mal funcionamiento de el gen responsable del Síndrome de RETT o disrupción respiratoria durante la vigilia (Julu y cols., 2001), que es el MeCP2 (Amir y cols., 1999; Chen y cols., 2001; Guy y cols., 2001), que es un regulador transcripcional represor de BDNF (Chen y cols., 2003; Martinowich y cols., 2003). La delección de este gen en ratones desacopla la expresión de BDNF de su fina regulación por parte de la actividad neuronal (Chen y cols., 2003). Sin embargo no se conoce cómo la desregulación de BDNF puede dar lugar a la patología característica del Síndrome de RETT.

Un resumen de los efectos que causan estas mutaciones lo vuelve a hacer Hilaire en su revisión del 2006:

1) **en mutantes *Rnx*** se observa que la formación de la mayoría de las neuronas noradrenérgicas está drásticamente comprometida, menos las neuronas del A6 que son parcialmente preservadas. En ella la frecuencia respiratoria es anormalmente alta al nacer, con ciclos respiratorios de muy alta variabilidad de duración y con frecuentes paradas respiratorias (Shirasawa y cols., 2000). Esto se explicaría por la falta de los grupos neuronales de A5, A1/C1 y A2/C2 durante la gestación. La pérdida de la inhibición del Área A5 sobre el Generador del Ritmo Respiratorio haría aumentar la frecuencia respiratoria, potenciada por la activación de las neuronas del A6. Además la falta de la facilitación

realizada por las neuronas A1/C1 junto con la estabilización de las neuronas A2/C2 hacen que el ciclo respiratorio se haga irregular.

2) **en mutantes *Phox2a*** se preserva la formación de la mayoría de las neuronas noradrenérgicas excepto las del A6. Esto genera una respiración alterada de los fetos obtenidos por cesárea en el día gestacional número 18 (Viemari y cols., 2004), con un ritmo in vitro anormalmente bajo. Esto se explicaría por la falta de activación que tendrían los receptores $\alpha 1$, lo que conlleva una preponderancia de la activación que llega a los receptores $\alpha 2$ por parte del Área A5, disminuyendo la frecuencia respiratoria.

3) **en mutantes *Ret***, la formación tanto del Área A5 como del A6 está alterada, sin alterar a los grupos noradrenérgicos bulbares (Viemari y cols., 2005). El análisis respiratorio de los fetos E18 nos da una tendencia a una frecuencia respiratoria más baja de lo normal, pero no estadísticamente significativa. En cambio, registros in vitro confirman el déficit respiratorio produciendo disminución de frecuencia respiratoria.

4) **en mutantes *Mecp2*** se observa también que la delección de este gen también produce déficit en el contenido en noradrenalina y de la respiración (Viemari cols., 2005). Produciendo anomalías en el ciclo respiratorio tanto en su duración como en la reducción de frecuencia respiratoria, consecuentes con déficit en los grupos A1/C1 y A2/C2.

5) **en mutantes *BDNF*** está deteriorada la expresión normal del comportamiento respiratorio al nacer (Erickson y cols., 1996). Estudios in vitro e in vivo muestran un ritmo respiratorio muy variable y deprimido durante el periodo postnatal. Además BDNF es necesario para la supervivencia postnatal de neuronas dopaminérgicas primarias, su inactivación puede alterar neuronas quimiorreceptoras aferentes

periféricas y la respuesta respiratoria a la hipoxia (Erickson y cols., 2001), así como la facilitación a largo plazo de la respiración por hipoxia intermitente (Baker-Herman y cols., 2004).

6) **en mutantes *Phox2b*** el mutante homocigoto para el gen tiene comprometida la supervivencia de todos los grupos neuronales noradrenérgicos, pero el heterocigoto puede sobrevivir. Poseen frecuentes apneas durante el sueño pero una respiración normal mientras están despiertos (Durand y cols., 2005). La mutación heterocigota para este gen se ha hallado en muchos pacientes con el mal de Ondine.

También se ha descrito que el estrés durante el periodo perinatal y neonatal puede afectar a la programación de expresión establecida para ciertos neurotransmisores y sus receptores, entre ellos la noradrenalina (Herlenius y Lagercrantz, 2004). Así, a parte de los factores genéticos, los factores epigenéticos también juegan un papel principal en el desarrollo del sistema noradrenérgico cuya alteración puede causar alteraciones respiratorias e hipoxia. Esto último puede afectar a la maduración y función de todas las neuronas cerebrales y sus circuitos funcionales, con consecuencias deletéreas en el sueño, memoria, comportamiento, etc. Queda patente, por tanto, que es necesario un desarrollo normal en el sistema noradrenérgico para asegurar un correcto desarrollo del sistema respiratorio durante el periodo perinatal y para una vida normal posterior.

En otro trabajo muy interesante (Benarroch y cols., 2008), se ha descrito que en pacientes diagnosticados con atrofia multisistémica se produce una pérdida severa de neuronas noradrenérgicas a nivel del Locus Cerúleus y del Área A5. Estos autores sugieren que la pérdida de este tipo de neuronas contribuye al desarrollo de este tipo de enfermedad, más concretamente, a los síntomas cardiorrespiratorios asociados a las funciones ya descritas de estas zonas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En continuidad con la línea de investigación mantenida desde hace años por el grupo de investigación en el que se ha venido desarrollando este trabajo, el presente estudio tiene por objeto esclarecer algunos de los mecanismos protuberanciales implicados en el control central cardiorrespiratorio

Se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar, en rata, la relación funcional de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral con el Área A5 protuberancial. Para ello, se aplicaron microinyecciones de:
 - a) Muscimol, agonista GABAérgico, que produce inhibición neuronal por hiperpolarización sostenida secundaria al aumento de permeabilidad al K^+ .
2. Caracterizar la función de la neurotransmisión glutamatergica en la interrelación funcional de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral y el Área A5 protuberancial. Para ello se aplicaron microinyecciones del antagonista general de receptores glutamatergicos en el Área A5 protuberancial:
 - a) Ácido Kinurénico, antagonista de receptores de aminoácidos excitadores.
3. Caracterizar la función de los distintos subtipos de receptores glutamatergicos en la interrelación funcional entre

la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral y el Área A5 protuberancial. Para ello se aplicaron microinyecciones de distintos tipos de antagonistas de receptores glutamatérgicos en el Área A5:

- a) DAP5, antagonista específico de receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA.
 - b) CNQX, antagonista específico de receptores de glutamato ionotrópicos de tipo no NMDA.
 - c) MCPG, antagonista general de receptores metabotrópicos.
4. Pretendemos que todo lo anterior permita aportar nuevos datos que contribuyan a esclarecer algunos de los mecanismos protuberanciales implicados en el control central cardiorrespiratorio y su posible participación en la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animal de experimentación

Los experimentos se han realizado en 76 ratas macho no consanguíneas SPF del tipo Sprague-Dawley de la cepa OFA-SD IOPS Caw, con un peso medio entre 250 y 300 gr, procedentes de la casa CRIFFA y estabuladas durante al menos dos semanas en el Estabulario de la Facultad de Medicina. Para todo el trabajo experimental se han seguido las normativas establecidas en las recomendaciones del ICLAS y de la directiva 86/809/CEE recogidas en el Real Decreto 23/1988 del 14 de Marzo. En todas las manipulaciones experimentales se han extremado las medidas para intentar reducir al mínimo el dolor y el estrés de los animales.

Los animales se han mantenido en ciclos de 16/8 horas de luz/oscuridad, con una temperatura media controlada de $21 \pm 1^\circ \text{C}$ y se han alimentado con dieta estándar de mantenimiento rata/ratón (A04 Panlab) y con agua descalcificada de la red general de abastecimiento. El agua y la comida se han administrado "*ad libitum*".

3.2. Preparación quirúrgica

Anestesia del animal

El anestésico empleado fue pentobarbital sódico (Penthotal) a una dosis de 60 mg/Kg de peso, administrado por vía intraperitoneal. El nivel de anestesia se valoró por ausencia de alteraciones de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca o respiratoria durante el pinzamiento de las extremidades posteriores. Siempre que fue necesario, se administraron dosis suplementarias de pentobarbital sódico, 2 mg/Kg por vía intravenosa, para mantener el nivel de anestesia.

Se rasuraron con esquiladora eléctrica las zonas siguientes: triángulo de Scarpa en la extremidad posterior izquierda, zona cervical anterior, región parieto-occipital y piel que cubre las regiones de las apófisis C7 y L2. A continuación se colocó el animal en posición de decúbito supino y se fijó por las cuatro extremidades y la boca en una mesa Palmer.

Traqueotomía y canulación traqueal

Se practicó una incisión cutánea longitudinal media a nivel del tercer anillo traqueal, de aproximadamente 1 cm de longitud en dirección caudal. A continuación se realizó disección por planos musculares y aislamiento de la tráquea, teniendo especial cuidado con los nervios laríngeos recurrentes para evitar su lesión. Una vez separados los nervios se pasaron dos hilos de sutura (calibre 0, métrico 3.5) por debajo de la tráquea y se procedió a su apertura mediante una incisión en cruz con termobisturí. Por último, se introdujo una cánula metálica (diámetro interno 2.5 mm) que se fijó para evitar su movimiento.

Canulación esofágica

Inmediatamente por debajo de la tráquea se localizó y aisló el esófago con hilo de sutura y se ligó la porción más craneal. Se practicó una incisión longitudinal media con termobisturí y se introdujo una cánula de propileno rellena de aire (0.8 mm de diámetro externo y 0.6 mm de diámetro interno) hasta aproximadamente 1 cm por encima del límite esternal caudal.

Se fijó después la cánula a la piel con hilo de sutura (calibre 0, métrico 3.5). La valoración de la presión esofágica colocando el catéter en el tercio inferior del esófago permite obtener un registro continuo de presión pleural.

Canulación de vena femoral

Se buscó por palpación el pulso femoral en el triángulo de Scarpa, inmediatamente por debajo del ligamento inguinal. Se practicó una incisión en la zona de la arteria femoral.

Se descubren vena y arteria femorales mediante disección roma y se pasó un hilo de referencia (hilo de sutura calibre 2/0, métrico 3) debajo de la vena femoral. Este hilo se deslizó en sentido distal en la vena. Otro hilo se colocó en sentido proximal. El hilo situado proximalmente se anudó, a la vez que se pinzaba la vena con unas pinzas hemostáticas miniaturizadas tipo bulldog (Aesculap). Se realizó una pequeña incisión transversal a través de la cual se introdujo un catéter con suero salino (diámetro interior 0.4 mm y exterior 0.8 mm) en la luz vascular. La introducción del catéter se acompañó de apertura controlada de la pinza hemostática. Una vez introducido el catéter se fijó con hilos de sutura (calibre 2/0, métrico 3).

Canulación arterial

Se procedió como en la canulación de la vena, anudando el hilo situado en la porción proximal y colocando las pinzas hemostáticas en la porción distal. Se realizó una pequeña incisión en la arteria, introduciendo un catéter (diámetro interior 0.4 mm y exterior 0.8 mm) purgado con suero heparinizado al 5% (heparina sódica BOIZOT). Una vez introducido el catéter se fijó con hilos de sutura (calibre 2/0, métrico 3).

Posteriormente se cerró la herida con grapas (12 X 2.5 mm de Medicon Instruments) y se conectaron los catéteres a los sistemas de venoclisis. En ambos sistemas se intercalaron llaves de tres vías para permitir la introducción de distintos fármacos.

Parietostomía bilateral posterior

Una vez canulada la tráquea, el esófago la arteria y vena femorales, se situó el animal sobre el aparato de estereotaxia (Kopf Instrument) en posición decúbito prono, con la barra superior 3.3 mm por debajo de la línea interaural (Paxinos y Watson, 1997). El animal se fijó por medio de barras laterales en los conductos auditivos externos y también se fijaron el hocico y la boca.

Una vez fijado el animal al aparato de estereotaxia, se colocó sobre un sistema de manta termostática homeotérmica, alimentado en DC (Harvard Aparatus) controlado por sonda rectal. La temperatura se mantuvo constante a 37 ± 0.5 °C.

Se realizó una incisión longitudinal media en la piel de la cabeza y se dejó al descubierto la calota mediante disección roma de aponeurosis y planos musculares con ayuda de una espátula. El diploe se cubrió de cera

ósea para evitar hemorragias. A continuación se practicó parietostomía posterior bilateral de 4 mm de diámetro, con ayuda de un taladro quirúrgico, en las coordenadas 4.0 mm posterior a bregma y 0.6 mm lateral a la línea media, para la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl); -1.0 mm posterior a la línea interaural y 2.4 mm lateral a la línea media, para la región del Área A5.

3.3. Variables registradas y material utilizado

En todos los experimentos se registraron directamente las siguientes variables:

- **Flujo respiratorio.**
- **Presión pleural.**
- **Presión arterial.**
- **Frecuencia cardiaca.**

Estas variables fueron analizadas durante el experimento. A partir de ellas podemos obtener otras variables como son la frecuencia respiratoria instantánea, tiempo inspiratorio y tiempo espiratorio, obtenidas a partir del flujo respiratorio, y valores de frecuencia cardiaca instantánea obtenidos a partir del registro de frecuencia cardiaca. Figura 3.3.1.

Almacenamiento y estudio de las señales

Las señales de las diferentes variables eran enviadas tras su obtención y amplificación a un panel de conexiones múltiples. Desde este panel se envían las señales a un sistema de almacenamiento digital (Neurocorder de Neuro-Data, modelo DR-890) y a un polígrafo de plumillas multicanal (SANEI) para su estudio posterior.

El sistema de almacenamiento consistía en un convertidor analógico-digital multiplexado, del cual utilizamos 6 canales (mode 4). Los diferentes canales y las variables grabadas "on line" en cada uno de ellos son; C2: flujo respiratorio; C3: presión pleural; C4: presión arterial; C6: frecuencia cardiaca. En todos ellos la frecuencia de muestreo fue de 11 KHz y el rango de trabajo de ± 8 voltios.

Durante el transcurso de la experiencia también quedaron grabadas las explicaciones dadas en tiempo real, sobre el desarrollo de los experimentos. Las señales, una vez digitalizadas, fueron almacenadas en cinta de vídeo comercial mediante grabación en vídeo grabador-reproductor (JVC).

Para el registro gráfico se dispuso en paralelo un polígrafo de plumillas de 7 canales, con 40 mm de ancho de registro por canal, con sensores y módulos de acondicionamiento. La velocidad del papel más frecuente para el registro de las variables fisiológicas fue de 100 mm/min.

Se utilizaron también dos programas de adquisición, análisis e impresión de señales: Spike2 (CED), con el convertidor analógico-digital 1401, y Chart 5.0 con el convertidor analógico-digital PowerLab.

Material técnico utilizado para el registro de las variables

Dispositivos y transductores

Transductores de presión

Para la medida de la presión pleural valorada como presión esofágica se utilizó un transductor de presión aneroide, de la casa Coulbourn Instruments, modelo T41-05 y un transductor de presión diferencial modelo SP-2040D, para la valoración del flujo respiratorio.

Estos transductores presentan una membrana balanceada por puente de Wheatstone. Las resistencias que constituyen el puente de Wheatstone son galgas extensométricas de una sustancia siliconada que varían su resistencia frente a pequeños estiramientos. Las galgas extensométricas pueden ser modificadas por la presión ejercida desde dos

compartimentos independientes, lo que permite obtener la diferencia entre las dos presiones actuantes.

Para la medida de la presión arterial se empleó un transductor modelo MP-15D, de la casa Coulbourn Instrument. Presenta un rango de actividad de -50 a 300 mmHg y una sensibilidad de 50 $\mu\text{V/V/cmHg}$.

Neumotacógrafo

Permitió el registro del flujo respiratorio. El modelo utilizado ha sido el tipo Fleisch (00) con una sensibilidad de 11.25 ml/s equivalente a 1 mm H₂O. Se conectó a la cánula traqueal. Consiste básicamente en un tubo rígido, cuyo diseño permite únicamente el paso de aire en régimen laminar. Para ello presenta en su interior un sistema de canalículos, formando una rejilla fina, que aseguran esa circulación laminar con una resistencia baja y constante del aire.

Podemos definir el flujo de un fluido como la razón entre la variación o gradiente de presión y la resistencia. Si la resistencia permanece constante, serán únicamente los cambios de presión los que modifiquen directamente el flujo de aire.

$$F=P/R, \text{ siendo;}$$

F: el flujo instantáneo; P: el gradiente de presión; R: la resistencia al flujo de aire.

Conectando el neumotacógrafo a un transductor de presión diferencial mediante dos conexiones situadas a cada uno de los lados de la resistencia mecánica, se obtuvo el gradiente de presión que es directamente proporcional al flujo de aire.

El registro obtenido es el neumotacograma, con variaciones cíclicas

de acuerdo con las fases de la respiración. De este modo, en cada ciclo respiratorio se pueden definir dos puntos de flujo cero, correspondientes al final de la inspiración y de la espiración y dos puntos de deflexión máxima del registro, correspondientes al flujo máximo inspiratorio y espiratorio. El flujo instantáneo puede definirse en cualquier momento del ciclo, correspondiendo con la pendiente de la curva inscrita en ese punto.

Tacómetro

La frecuencia cardiaca instantánea se obtuvo mediante tacómetro, modelo S77-26 de la casa Coulbourn Instruments. El sistema consiste en un procesador analógico que convierte el intervalo interlatido en un determinado valor de voltaje de salida que es proporcional a la señal de entrada. Sus características principales son: frecuencia de respuesta desde 4 a 1500 entradas/min. Tiempo de respuesta inmediata, con una estabilidad 1.5%. La señal de entrada fue la dP/dt obtenida desde el registro de presión arterial.

Amplificadores

Para el registro de presión pleural, flujo respiratorio y presión arterial se utilizaron amplificadores modelo S72-25, de la casa Coulbourn Instruments, con un nivel de entrada máximo de 10 mV, una resistencia de entrada de $10^{10} \Omega$ y una impedancia de salida de 50Ω .

Otros dispositivos empleados

Osciloscopio digital

Modelo VC-6023 de Hitachi. Este dispositivo permite trabajar con dos canales simultáneos, digitalizar la señal y mediante un programa propio

calcular dimensiones y exportar resultados a un ordenador o plotter. Se utilizaron dos unidades. Una de ellas se utilizó para visualizar flujo y presión pleural, pudiéndose calcular también la resistencia respiratoria, gracias a la posibilidad de graficar estas 2 variables en el modo XY.

La otra unidad fue utilizada para visualizar la intensidad de la estimulación eléctrica en tiempo real. La intensidad se obtenía de forma indirecta haciendo pasar un voltaje conocido a través de una resistencia de valor conocido. Dividiendo el valor del voltaje por la resistencia se obtiene el valor de la intensidad.

Osciloscopio analógico

Modelo 5112 de Tektronik. Este dispositivo permite trabajar con 5 canales simultáneos. Se utilizó para visualizar en tiempo real el flujo respiratorio, la presión pleural y la presión arterial.

Además, permitió la presentación simultánea y en tiempo real de los potenciales de campo extracelulares (PAE) y flujo respiratorio. Por lo cual, podía estimarse cualitativamente la posible relación física entre ambos eventos y proceder a su estudio y almacenamiento. Así mismo, podía presentarse en pantalla la presión pleural, presión arterial y los impulsos del generador de rampa, que convierte los PAE detectados en impulsos TTL.

Electrodos de estimulación bipolares

Se utilizaron electrodos de estimulación concéntricos bipolares (SNE 100, Rhodes Medical Electrodes).

Microposicionador electrohidráulico

Se utilizó para realizar desplazamientos micrométricos del microelectrodo de estimulación. El modelo utilizado fue el 607-W de David Kopf Instruments, con un recorrido mínimo de 1 μ m.

Mesa antivibratoria de gas

Se utilizó para impedir la transmisión de vibraciones desde el medio externo a la preparación experimental. El modelo utilizado fue el TMC sys 63530.

Microscopio quirúrgico

Usado para visualizaciones de campos quirúrgicos y campos de registros electrofisiológicos. El modelo utilizado fue el Leica M-300.

Torre de estereotaxia

Modelo SM-11 de Narishige. Soportaba al microposicionador para la microinyección en el Área A5.

Amplificador – Medidor de impedancia – Actuador

Modelo 010/v 1.0 de JSS. Con diferentes módulos que permitían diferentes funciones como la amplificación diferencial de la señal captada por el microelectrodo y previamente preamplificada por una subunidad perteneciente al mismo sistema. La señal se amplificó en estas dos etapas x10. El rechazo en modo común, fue de 100 DB a 50 kHz. La estabilidad del voltaje de salida fue de ± 5 V. (error de <25 μ V.). La señal fue filtrada mediante un sistema analógico en banda de 3 kilociclos y a una amplitud de

3 DB por octava.

La medición de impedancia se llevó a cabo mediante la inyección de corriente y compensación de resistencia y capacitancia. El actuador utilizado posibilitaba la mejora del registro por limpieza del microelectrodo mediante la inyección de pulsos de corriente de 2.5 v y 60 ms de duración.

Amplificador de audio

Sony c-12 permitía hacer audibles las descargas de PAE así como del ritmo cardíaco.

Generador de onda cuadrada

Modelo CS-220A de la casa Cibertec. Se utilizó como fuente de impulsos para la estimulación a través de los microelectrodos de estimulación.

Unidad de aislamiento

Para evitar la aparición de posibles artefactos en la señal. Modelo 100 de Cibertec.

Convertidor analógico/digital

Es un sistema multiplexado, digital/analógico de 8 canales de la marca Neuro Data. Instrument Corp. modelo Neuro Corder DR-890.

Grabador-reproductor de señales digitales

Sistema de vídeo JVC-VHS. HR-D211EM y almacenamiento en

cintas de vídeo-cassette E-180 VHS de TDK.

Polígrafo

Se empleó un registrador con impresión térmica SANEI, de 8 canales, con 40 mm de ancho de registro por canal, con sensores y módulos de acondicionamiento. Cada uno de estos canales de registro consiste en un registrador del tipo de bobina móvil, en el que la pluma térmica permanece unida a una bobina que puede girar en los dos sentidos, entre los polos de un imán. Como la impedancia de entrada de la bobina es baja, la señal sufre un proceso de amplificación que incrementa la tensión de la señal pero también necesita una preamplificación de potencia.

Las deflexiones de la pluma se registran sobre papel que se desliza bajo las mismas en sentido transversal al giro de las plumas. La superposición de ambos movimientos es la que proporciona la representación gráfica de la variable en el tiempo. Se utilizaron rollos de papel para impresora térmica con coordenadas cartesianas rectangulares. La velocidad de papel más frecuente para el registro de las variables fisiológicas fue de 100 mm/min.

Panel de conexiones múltiples

Con una capacidad de 28 entradas intercambiables y 45 salidas. Diseñado por el profesor Marc Stefan Dawid Milner y fabricado por la empresa Álava Ingenieros.

Microinyector

Se utilizó el modelo micro4™ de (WPI). Se empleó para realizar las microinyecciones, en las cuales se utilizaron micropipetas de vidrio selladas

con tubo de silicona con conexión a micropipeta Hamilton 7000.5 N para una inyección máxima de 500 nl.

Micropipetas de vidrio

Se utilizan capilares de vidrio de 5-10 μm de diámetro (Clark Electromedical Instruments, GC150F-10), para realizar microinyecciones de fármacos. Los electrodos se estiran en una forja de electrodos de barra múltiple de la casa Narishige de Japón, modelo PE-2, con una rotación de 270°.

3.4. Fármacos utilizados

Pentotal Sódico

Como anestésico ha sido utilizado Pentotal sódico 60 mg/Kg i.v.

Dosis de ataque: 0.1 ml/100g i.p.

Dosis de mantenimiento: 0.1-0.2 ml i.v. de una dilución al 20 % de 0.2 ml de solución de 60 mg/Kg en 0.8 ml de suero salino.

Muscimol

Es un análogo de GABA aislado del hongo alucinógeno *Amanita muscaria*. Es uno de los más selectivos y potentes agonistas del GABA que se conocen. Se fija a los receptores de éste y provoca un estado de hiperpolarización neuronal sostenido por aumento de la permeabilidad al K⁺.

La solución empleada fue 4 mM, inyectándose 50-100 nl, lo que implica una dosis de 0.2-0.4 nmoles.

Ácido Kinurénico

Es un antagonista competitivo de receptores de aminoácidos excitadores incluyendo glutamato, glicina y D-serina.

La solución empleada fue 100 mM, inyectándose 50-100 nl, lo que implica una dosis de 5-10 nmoles.

DAP5

2R-amino-5-fosfono pentanoato (DAP5). Es un antagonista

selectivo de receptores ionotrópicos de glutamato que produce el bloqueo de receptores del tipo NMDA.

La solución empleada fue 2 mM, inyectándose 50-100 nl, lo que implica una dosis de 0.1-0.2 nmoles.

CNQX

6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-dione (CNQX). Es un antagonista de receptores ionotrópicos de glutamato que produce el bloqueo de receptores de tipo no NMDA.

La solución empleada fue 1 M, inyectándose 50-100 nl, lo que implica una dosis de 50-100 nmoles.

MCPG

α -Metil-(4-carboxi-fenil) glicina (MCPG). Es un antagonista no selectivo (general) de receptores metabotrópicos de glutamato.

La solución empleada fue 10 mM, inyectándose 50-100 nl, lo que implica una dosis de 0.5-1 nmoles.

3.5. Protocolo experimental

Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) antes y después de la aplicación de distintos fármacos en el Área A5

Se situó estereotáxicamente el microelectrodo de estimulación en la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) (coordinada posterior desde bregma -4.0 mm, 0.6 mm lateral a la línea media y de 4.5 - 5.0 mm de profundidad con respecto a la superficie cerebral, Paxinos y Watson, 1997). Hay que tener en cuenta que la torre del equipo de estereotaxia donde está fijado el microelectrodo de estimulación, penetra en el cerebro del animal con una inclinación de 30° para evitar problemas de espacio con la segunda torre del equipo de estereotaxia, que se utiliza para la microinyección de fármacos en el área A5. Para la estimulación eléctrica se utiliza un electrodo de estimulación concéntrico bipolar (SNE 100, RODHES Medical Electrodes). El resumen esquemático de este protocolo experimental se recoge en la Figura 3.3.1.

Se analizaron los cambios cardiovasculares y respiratorios durante estimulación eléctrica (30 - 40 μ A, 100 Hz, pulsos de 1 ms, durante 5 s) de la SGPdl.

Los cambios en los parámetros respiratorios y cardiovasculares provocados durante la estimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) se analizaron antes y después de la microinyección de distintos fármacos. Cada fármaco se corresponde con un grupo experimental. Se utilizaron PBS, Muscimol, Kinurénico, DAP5, CNQX y MCPG en el Área A5.

Se utilizó un microelectrodo de estimulación eléctrica en la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) (para la estimulación eléctrica), y una micropipeta de vidrio colocada en el Área A5 para las microinyecciones de los diferentes fármacos.

Después de estimular eléctricamente la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl), se inyectó, en grupos experimentales distintos, Muscimol 4 mM (50-100 nl, 0.2-0.4 nmoles, pH 7.4 ± 0.1 , durante 5 s), Kinurénico 100 mM (50-100 nl, 5-10 nmoles, pH 7.4 ± 0.1 , durante 5 s), DAP5 2mM (50-100 nl, 0.1-0.2 nmoles, pH 7.4 ± 0.1 , durante 5 s), CNQX 1 M (50-100 nl, 50-100 nmoles, pH 7.4 ± 0.1 , durante 5 s) y MCPG 10 mM (50-100 nl, 0.5-1 nmol, pH 7.4 ± 0.1 , durante 5 s) en el Área A5. Para la microinyección la micropipeta de vidrio se rellena del fármaco correspondiente disuelto en PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4 ± 0.1) con un 1% de Azul de Evans para marcar el lugar de inyección (Figura 3.3.1).

Se esperaron 4 minutos. Se analizaron los cambios cardiovasculares y respiratorios durante la estimulación eléctrica (30-40 μ A, 100 Hz, pulsos de 1 ms durante 5 s) de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) tras la microinyección de cada fármaco.

Por último, se observaron las diferencias obtenidas entre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl) antes de la microinyección de los diferentes fármacos, y la respuesta obtenida tras la microinyección de los mismos.

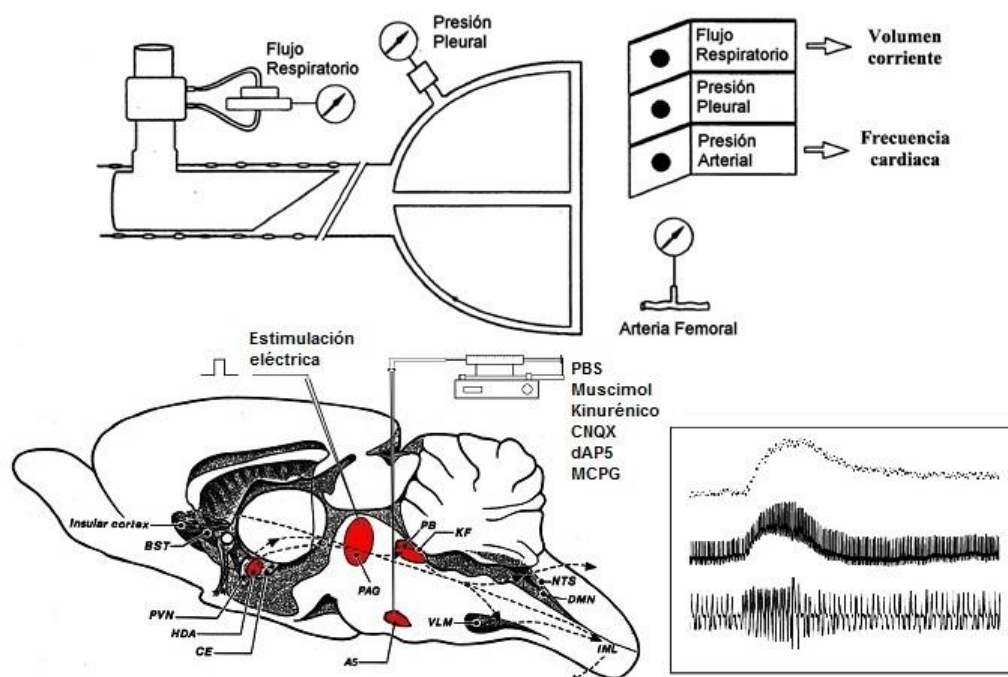


Figura 3.3.1. Diseño general del montaje y variables registradas durante la estimulación eléctrica (30-40 μ A, 100 Hz, 1 ms, durante 5 segundos) de la Sustancia Gris Periacueductal Dorsolateral antes y después de la microinyección en el Área A5 de Muscimol (50-100 nl, 0.2-0.4 nmol), Kinurénico (50-100 nl, 5-10 nmol), CNQX (50-100 nl, 50-100 nmol), DAP5 (50-100 nl, 50-100 nmol) y MCPG (50-100 nl, 0.5-1 nmol). Todas las señales fueron visualizadas en tiempo real mediante polígrafo y almacenadas en un sistema digital por medio de convertidor A/D para el análisis posterior.

3.6. Procesamiento histológico

Las lesiones eléctricas producidas por el electrodo de estimulación de la SGPdl, y la microinyección de Azul de Evans en el Área A5 nos permitieron marcar la posición de ambos núcleos. Al final de los experimentos se inyectó pentotal sódico, 4 mg/Kg por vía intravenosa, para inducir una anestesia profunda. A continuación se extrajo el encéfalo. Se realizó transección medular entre los límites bulboespinal y medio colicular.

Se introdujo el tronco del encéfalo en una solución de formol 50 ml al 5% y se procedió a cortarlo en secciones de 80 μ m, con criotomo (Leica Instruments GmbH, Mod.1206). Los cortes así obtenidos fueron posteriormente teñidos con rojo neutro. (Figura 3.6.1).

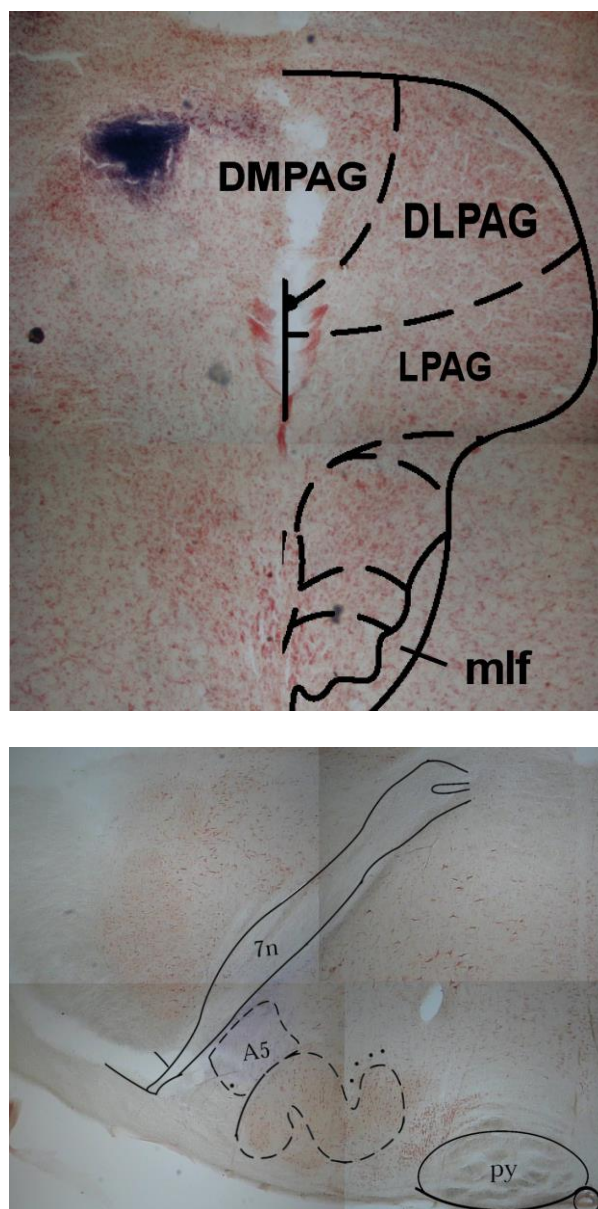


Figura 3.6.1. Fotografías de dos cortes coronales de secciones de 80 μm teñidos con rojo neutro que muestran las dos regiones de trabajo. En la parte superior se aprecia el tejido microcoagulado marcando el punto de estimulación eléctrica de la SGPdl tras pasar una corriente de 250 μA al final del experimento. En la fotografía inferior se puede apreciar el lugar exacto de la microinyección realizada en el Área A5 gracias a la tonalidad violácea que adquiere el tejido en contacto con el colorante Azul de Evans. Se ha superpuesto en ambas fotografías un esquema extraído del Atlas de Paxinos y Watson.

3.7. Tratamiento estadístico

Los procedimientos del cálculo utilizado se han adaptado a las características de las variables, teniendo en cuenta el error por la distinta reactividad de los animales componentes de cada muestra.

Para valorar los resultados de las medias obtenidas dentro de un mismo grupo de animales, una vez comprobada la normalidad y homocedasticidad de las variables de cada muestra se realizó mediante análisis de la varianza y el test de Student – Newman – Keuls de comparación múltiple. Las diferencias han sido consideradas significativas cuando $p < 0.05$. En todos los casos, se han utilizado representaciones gráficas en forma de histograma.

La distribución total de animales utilizados en cada uno de los grupos de experiencias ha servido para disponer del número necesario en cada caso concreto para el estudio estadístico. Ha sido posible reunir series de animales con datos muy homogéneos.

Se realizaron medidas del tiempo inspiratorio, tiempo espiratorio, frecuencia respiratoria instantánea, presión arterial y frecuencia cardíaca instantánea. Estas medidas han sido tomadas 5 segundos antes de la estimulación, durante la estimulación y 20 segundos después de la estimulación. Sólo se han valorado los datos obtenidos en las experiencias en las que el estudio histológico demostró que las distintas estimulaciones y microinyecciones fueron realizadas en la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdI) y/o Área A5, respectivamente.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la Sustancia gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl)

Respuesta respiratoria

Se caracterizó la respuesta respiratoria obtenida tras la estimulación eléctrica de la SGPdl en ratas con respiración espontánea (n=7).

La respuesta respiratoria consistió en un aumento en la frecuencia respiratoria ($p<0,001$) debida a una disminución del tiempo espiratorio ($p<0,001$). No hubo cambios significativos en el tiempo inspiratorio.

Respuesta cardiovascular

La estimulación eléctrica de la SGPdl produce una respuesta presora consistente en un aumento de la presión arterial ($p<0,001$) acompañada siempre de un aumento en la frecuencia cardíaca ($p<0,001$).

4.2. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de PBS (phosphate buffer saline) en el Área A5

Antes de iniciar todos y cada uno de los estudios realizados, se efectuaron una serie de experimentos controles (n=7). En ellos se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de una disolución compuesta de PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4 ± 0.1) y azul de Evans 1% (50 – 100 nl) en el Área A5.

La respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes de la microinyección se caracterizó por un incremento de la frecuencia respiratoria debida a una disminución del tiempo espiratorio e incremento de la presión arterial y frecuencia cardiaca. Figuras 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5; Tablas 4.2.I, 4.2.II y 4.2.III.

La localización de las zonas de microinyección se observa en la Figura 4.2.1.

La microinyección de PBS (50 – 100 nl, n=7) en el Área A5 no tuvo ningún efecto sobre las variables cardiorrespiratorias en reposo.

Pasados cuatro minutos de la microinyección de PBS en el Área A5 no se modificaron los valores de reposo en ninguna de las variables cardiorrespiratorias registradas: frecuencia respiratoria (de 85 ± 5 a 71 ± 3 rpm), presión arterial (de 92 ± 1 a 90 ± 1 mmHg) y cardiaca de reposo (de 352 ± 12 a 354 ± 14 cpm). Figuras 4.2.4 y 4.2.5. Tablas 4.2.I y 4.2.II.

Respuesta respiratoria.

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl no se modifica tras la microinyección de PBS en el Área A5:

Tras cuatro minutos de la microinyección de la solución de PBS, la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria (de 71 ± 3 a 116 ± 4 rpm, $p < 0.001$), por disminución del tiempo espiratorio (de 0.663 ± 0.04 a 0.321 ± 0.02 s., $p < 0.001$) acompañado por incremento de la presión pleural inspiratoria (de 0.393 ± 0.02 a 0.506 ± 0.03 cmH₂O, $p < 0.05$). No se produjeron cambios en el tiempo inspiratorio (de 0.193 ± 0.01 a 0.203 ± 0.01 s). Figura 4.2.2; Tabla 4.2.I.

El incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria es de 44 ± 10 rpm, este incremento se produjo por una disminución en valores absolutos del tiempo espiratorio de 0.342 ± 0.07 s. El cambio en valores absolutos del tiempo inspiratorio y de la presión pleural inspiratoria son de 0.01 ± 0.01 s y 0.110 ± 0.05 cmH₂O, respectivamente. Figura 4.2.4; Tabla 4.2.III.

No existen diferencias en los cambios en valores absolutos del incremento de la frecuencia respiratoria (de 39 ± 8 a 44 ± 10 rpm) y de la disminución del tiempo espiratorio (de 0.237 ± 0.02 a 0.342 ± 0.06 s.) así como del incremento de presión pleural inspiratoria (de 0.140 ± 0.02 a 0.110 ± 0.05 cmH₂O). Figura 4.2.4; Tabla 4.2.III.

Respuesta cardiovascular

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI no se modifica tras la microinyección de PBS en el Área A5:

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica *la SGPdI* 4 minutos después de la microinyección de PBS en el Área A5 se caracterizó por un incremento de presión arterial (de 90 ± 1 a 121 ± 3 mmHg, $p < 0.001$), acompañado de un incremento en la frecuencia cardiaca (de 354 ± 14 a 381 ± 15 cpm, $p < 0.001$). Figura 4.2.3; Tabla 4.2.II.

El incremento en valores absolutos de la presión arterial y frecuencia cardiaca es de 31 ± 4 mmHg y 27 ± 3 cpm, respectivamente. Figura 4.2.5; Tabla 4.2.III.

No se modifica el incremento en valores absolutos de presión arterial (de 30 ± 3 a 31 ± 4 mmHg) y de frecuencia cardiaca (de 37 ± 4 a 27 ± 3 cpm). Figura 4.2.5; Tabla 4.2.III.

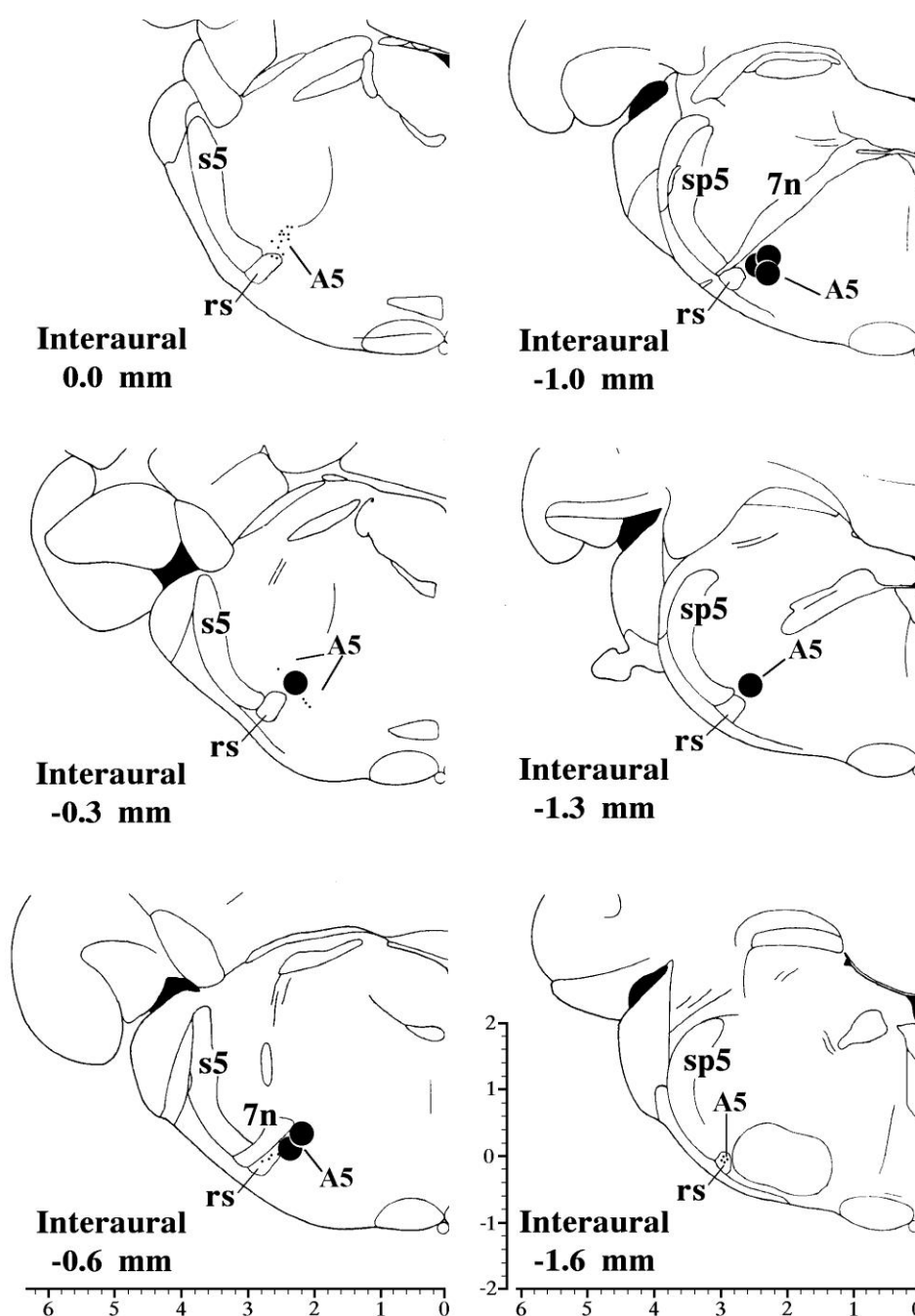
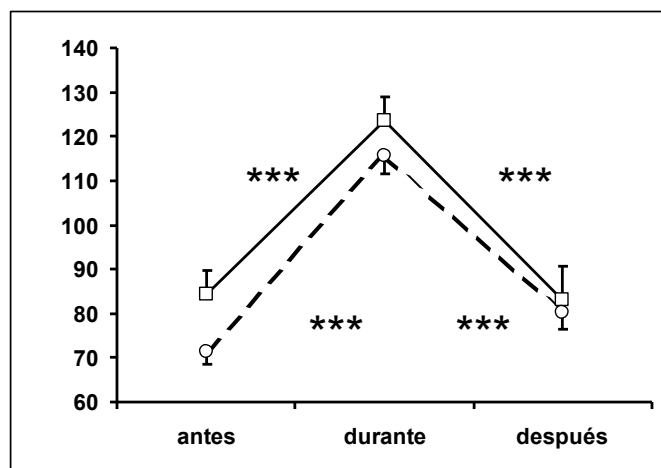


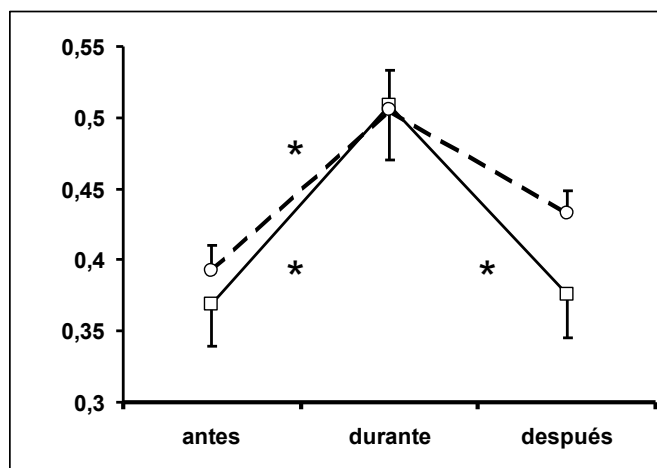
Figura 4.2.1. Esquematzación en secciones coroneles del Área A5 desde la porción rostral (parte superior izquierda) a la porción caudal (parte inferior derecha), que muestra la localización de las zonas de microinyección de PBS en el Área A5.

(A5) Área A5 catecolaminérgica; (7n) nervio facial o raíz de este nervio; (rs) tracto rubroespinal; (s5) raíz sensorial del nervio trigémino; (sp5) tracto trigéminoespinal.

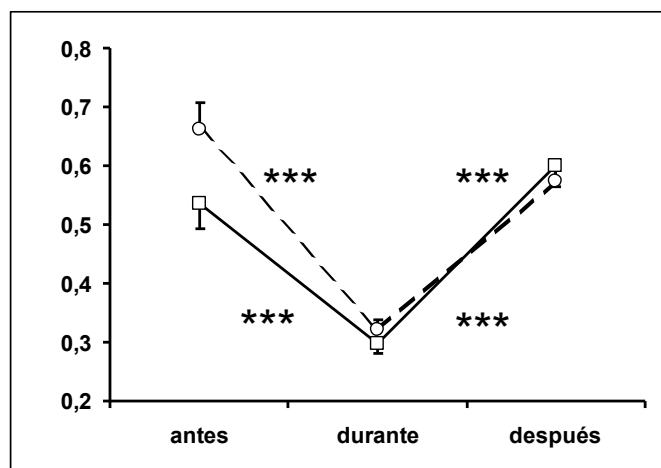
Frecuencia Respiratoria (rpm)



Presión Pleural (cmH₂O)



Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

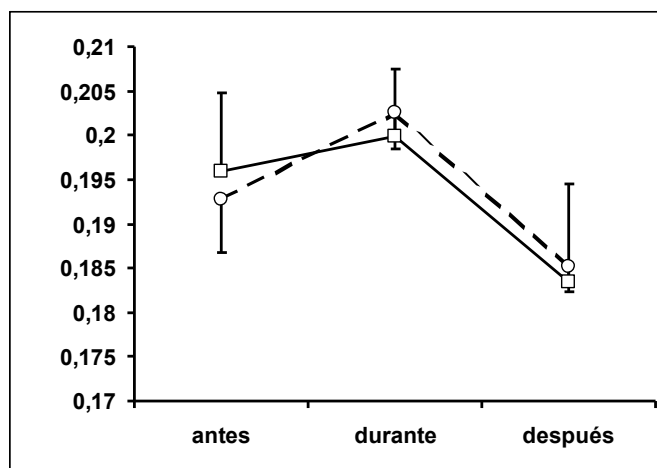
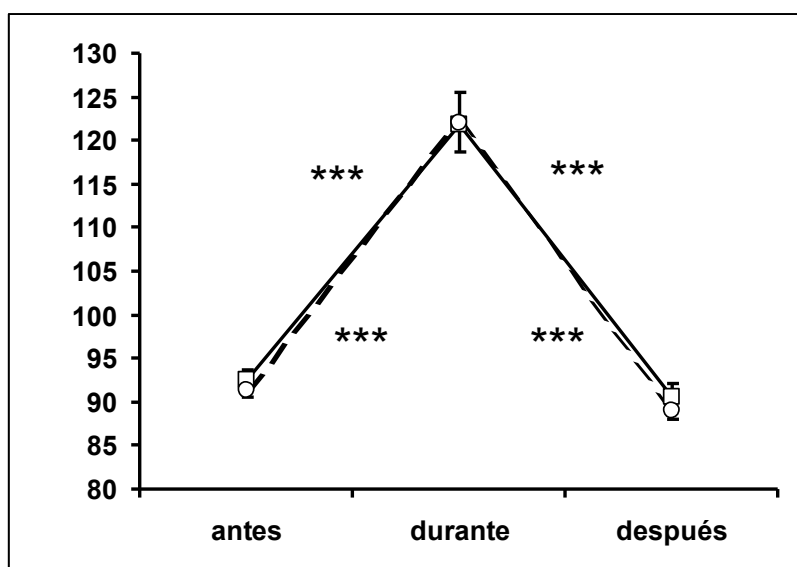


Figura 4.2.2 Cambios en los parámetros respiratorios promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdI. Se representan, de arriba hacia abajo, frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de PBS en el Área A5.

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Presión Arterial (mmHg)



Frecuencia Cardíaca (cpm)

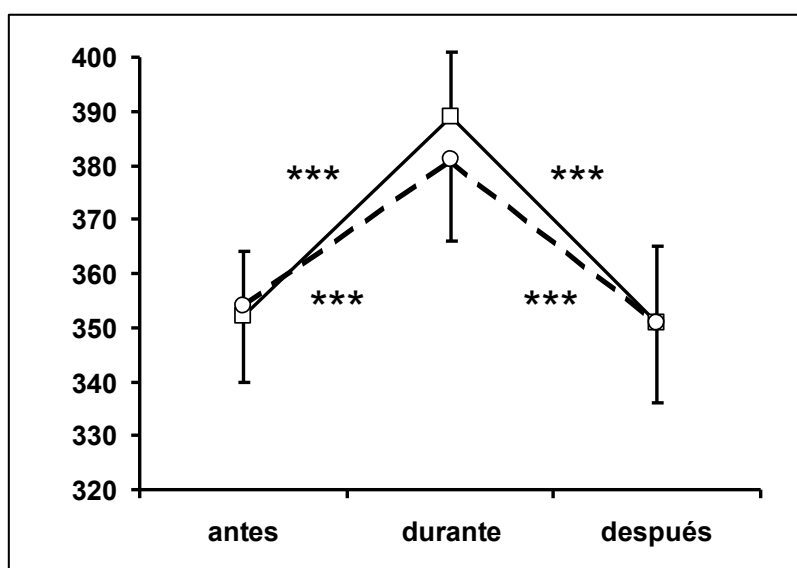


Figura 4.2.3. Cambios en la respuesta presora (arriba) y cardíaca (abajo) promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdI.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de PBS en el Área A5. Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

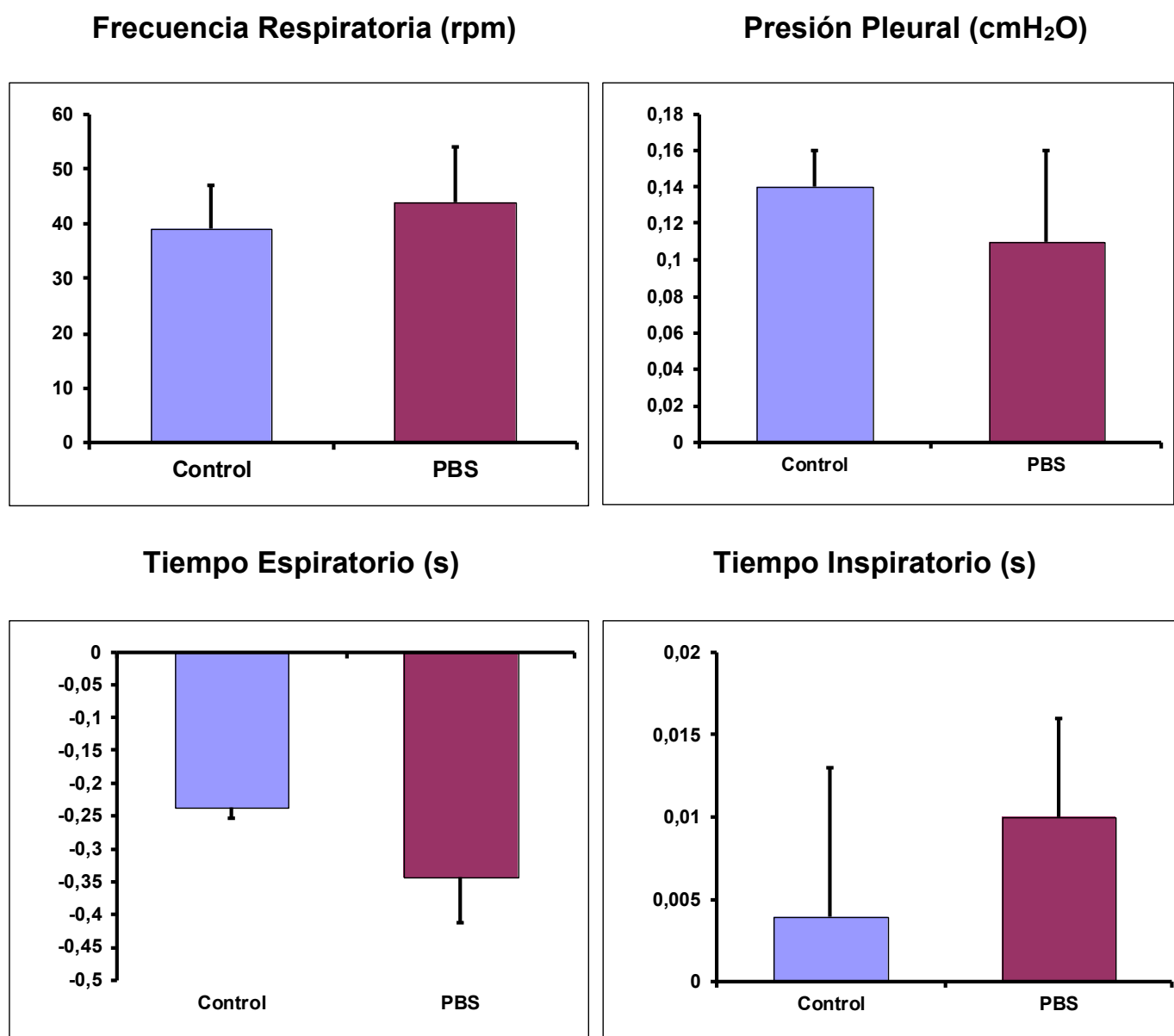


Figura 4.2.4. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de las variables respiratorias durante la estimulación eléctrica de la SGPdI. Se representan de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, la frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

En azul se representa la estimulación control. En rojo se representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de PBS en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

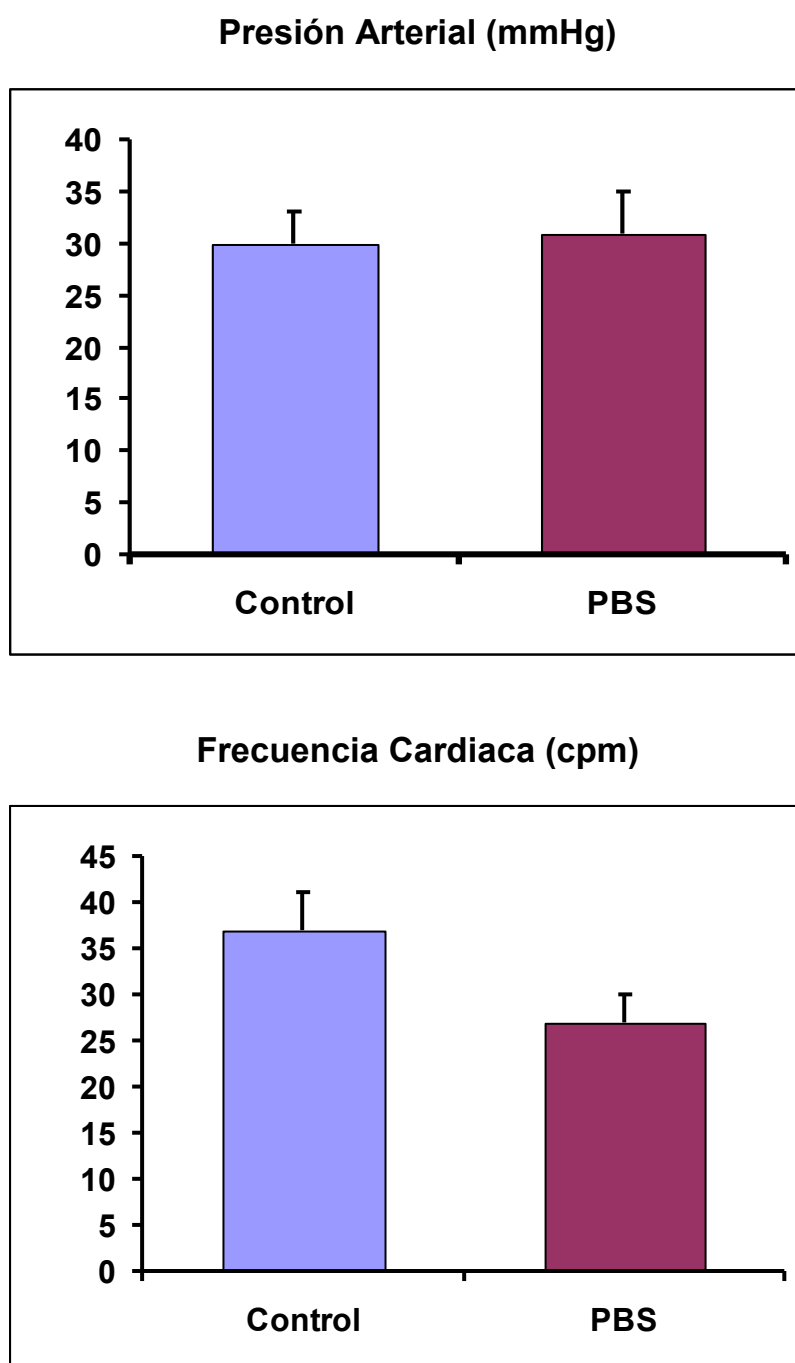


Figura 4.2.5. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de la presión arterial (arriba) y frecuencia cardiaca (abajo) durante la estimulación eléctrica de la SGPdl.

En azul se muestra la estimulación control y en rojo la estimulación de la SGPdl tras microinyección de PBS en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media.

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Ti (s)	Ctrl	0.196 ± 0.01	0.199 ± 0.01	0.183 ± 0.01
	PBS	0.193 ± 0.01	0.203 ± 0.01	0.185 ± 0.01
Te (s)	Ctrl	0.536 ± 0.05	0.299 ± 0.02 ***	0.599 ± 0.09
	PBS	0.663 ± 0.04	0.321 ± 0.02 ***	0.574 ± 0.03
FR (rpm)	Ctrl	85 ± 5	123 ± 5 ***	83 ± 7
	PBS	71 ± 3	116 ± 4 ***	80 ± 3
PP(cmH ₂ O)	Ctrl	0.369 ± 0.03	0.509 ± 0.04 *	0.376 ± 0.03
	PBS	0.393 ± 0.02	0.506 ± 0.03 *	0.433 ± 0.02

Tabla 4.2.I. Respuesta respiratoria evocada por estimulación de la SGPdI antes, durante y después de la microinyección de PBS en el Área A5. Se muestran los valores promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR) y presión pleural (PP).

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
PA (mmHg)	Ctrl	92 ± 1	122 ± 4 ***	91 ± 2
	PBS	90 ± 1	121 ± 3 ***	89 ± 1
FC (cpm)	Ctrl	352 ± 12	389 ± 12 ***	351 ± 14
	PBS	354 ± 14	381 ± 15 ***	351.0 ± 15

Tabla 4.2.II. Respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPdI antes, durante y después de la microinyección de PBS en el Área A5. Se muestran los valores promediados de presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Todos los datos se muestran como media ± el error estándar de la media. Los valores de p son: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	Ti (s)	Te (s)	FR(rpm)	PP(cmH ₂ O)	PA(mmHg)	FC(cpm)
Control	0.004 ± 0.01	0.237 ± 0.02	39 ± 8	0.140 ± 0.02	30 ± 3	37 ± 4
PBS	0.010 ± 0.01	0.342 ± 0.07	44 ± 10	0.110 ± 0.05	31 ± 4	27 ± 3

Tabla 4.2.III. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación de la SGPdl antes y después de la microinyección de PBS en el Área A5.

Se muestran los cambios en valores absolutos promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

4.3. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de Muscimol en el Área A5

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de Muscimol (50-100 nl, 0.2-0.4 nmol) en el Área A5 (7 ratas).

La respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes de la microinyección se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio, incremento de la presión pleural inspiratoria y aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca. Figuras 4.3.2A, 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5, 4.3.6; Tablas 4.3.I, 4.3.II y 4.3.III.

La localización de las zonas de microinyección se observa en la figura 4.3.1.

La microinyección de Muscimol en el Área A5 (50-100 nl, 0.2-0.4 nmol, n=7) produjo una respuesta bifásica (pequeño aumento seguido de disminución) en la presión arterial en 2 ratas, con ligero aumento de frecuencia respiratoria. En el resto, 5 ratas, se produjo un incremento de presión arterial, en 2 de ellas muy elevado, acompañado en todas ellas de un ligero aumento de la frecuencia cardíaca. Con respecto a la componente respiratoria en estos 5 animales, se produce apnea en 3 de ellos y un ligero aumento de frecuencia respiratoria en los otros dos.

Tras cuatro minutos de la microinyección de Muscimol en el Área A5 se produjo disminución no significativa de la frecuencia respiratoria de reposo (de 107 ± 4 a 101 ± 5 rpm) debido a una disminución del tiempo

espiratorio (de 0.355 ± 0.02 a 0.393 ± 0.02 s, $p < 0.05$). Figuras 4.3.3, 4.3.4; Tablas 4.3.I y 4.3.II.

Respuesta respiratoria

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI se modifica significativamente tras la microinyección de Muscimol en el Área A5:

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI 4 minutos después de la microinyección de Muscimol en el Área A5 se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria (de 101 ± 5 a 123 ± 7 rpm, $p < 0.001$) por disminución del tiempo espiratorio (de 0.393 ± 0.02 a 0.285 ± 0.02 s, $p < 0.001$). No se produjeron cambios en la presión pleural inspiratoria (de 0.321 ± 0.02 a 0.391 ± 0.02 cmH₂O) ni en el tiempo inspiratorio (de 0.211 ± 0.009 a 0.212 ± 0.009 s). Figuras 4.3.2B, 4.3.3; Tabla 4.3.I.

El incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria es de 23 ± 5 rpm, este incremento se produjo por una disminución en valores absolutos del tiempo espiratorio de 0.125 ± 0.01 s. El cambio en valores absolutos del tiempo inspiratorio es de 0.001 ± 0.01 y de presión pleural inspiratoria es de 0.068 ± 0.01 cmH₂O. Figura 4.3.5; Tabla 4.3.III.

Existen diferencias significativas en el incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria (de 37 ± 6 a 23 ± 5 rpm, $p < 0.01$), pero no del tiempo espiratorio (de -0.109 ± 0.01 a -0.125 ± 0.01 s). Figura 4.3.5; Tabla 4.3.III.

Respuesta cardiovascular

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica significativamente tras la microinyección de Muscimol en el Área A5. El incremento de la presión arterial se ve disminuido, y el de la frecuencia cardiaca queda prácticamente abolido tras la microinyección de Muscimol en el Área A5:

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de Muscimol en el Área A5 se caracterizó por un incremento de presión arterial (de 118 ± 4 a 157 ± 2 mmHg, $p < 0.001$) y un ligero aumento de la frecuencia cardiaca (de 375 ± 7 a 382 ± 8 cpm). Figuras 4.3.2B, 4.3.4; Tabla 4.3.II.

Los cambios en valores absolutos de la presión arterial y frecuencia cardiaca son de 39 ± 2 mmHg y 7 ± 9 cpm respectivamente. Figura 4.3.6; Tabla 4.3.III.

Se produjo un menor incremento en valores absolutos de presión arterial (de 47 ± 4 a 39 ± 2 mmHg, $p < 0.05$) y el aumento de la frecuencia cardiaca queda prácticamente abolido (de 54 ± 10 a 7 ± 9 cpm, $p < 0.001$). Figura 4.3.6; Tabla 4.3.III.

Otros resultados

Hay que indicar que, en 3 animales, la microinyección de Muscimol provocó una depresión gradual de la frecuencia respiratoria, que finaliza con la muerte del animal (localización de la microinyección en el Área A5). En estos casos el volumen de la microinyección fue de 300 nl.

En otros 6 animales se microinyectó fuera de la zona de estudio. Cinco animales no sufrieron ningún cambio tras la estimulación de la SGPdl (localización de los puntos de microinyección en zonas del núcleo sensorial principal del trigémino parte ventrolateral – tracto espinal del trigémino, Pr5VL-Sp5). En un animal se produce disminución de la frecuencia cardíaca y apnea como consecuencia de la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de Muscimol (la microinyección se localizó encima de la salida del nervio facial, 7n).

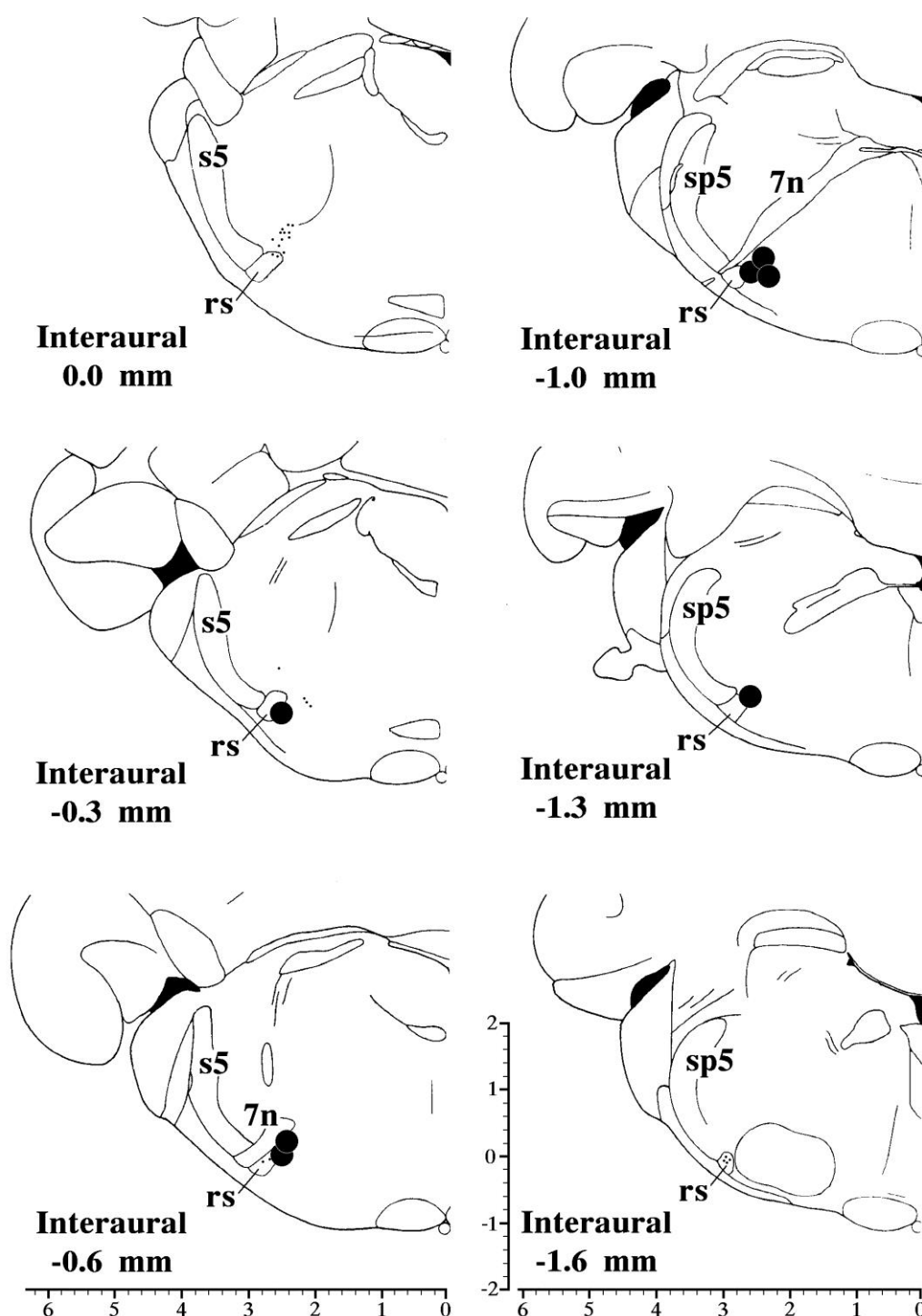


Figura 4.3.1. Esquematización en secciones coronales del Área A5 desde la porción rostral (parte superior izquierda) a la porción caudal (parte inferior derecha), que muestra la localización de las zonas de microinyección de Muscimol en el Área A5.

(A5) Área A5 catecolaminérgica; (7n) nervio facial o raíz de este nervio; (rs) tracto rubroespinal; (s5) raíz sensorial del nervio trigémino; (sp5) tracto trigéminoespinal.

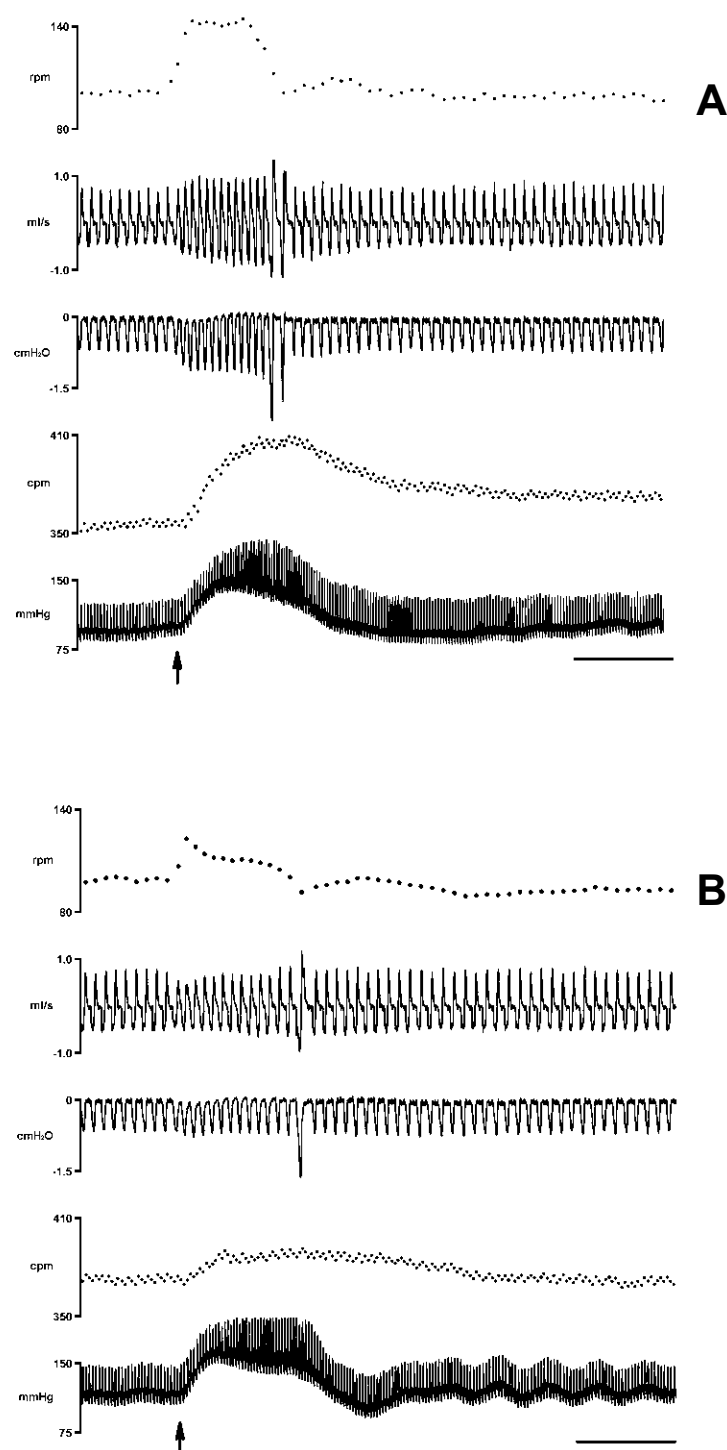
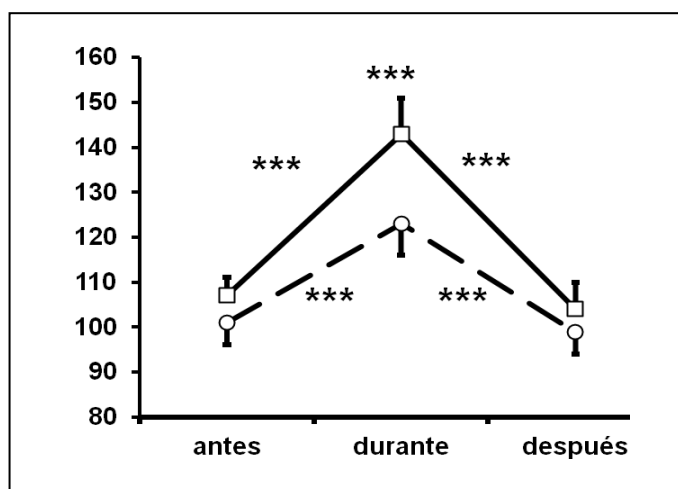
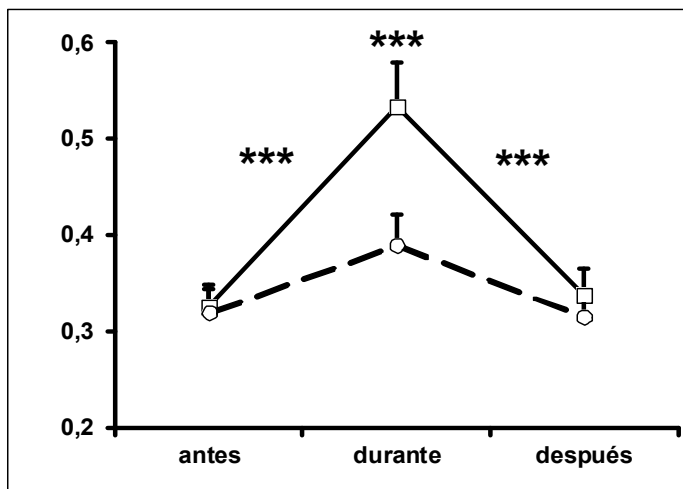


Figura 4.3.2. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación eléctrica de la SGPAI antes (A) y cuatro minutos después (B) de la microinyección de Muscimol en el Área A5 (flecha vertical hacia arriba). La estimulación eléctrica tiene una duración de cinco segundos. Se representan de arriba hacia abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea, flujo respiratorio, presión pleural, frecuencia cardíaca instantánea y presión arterial.

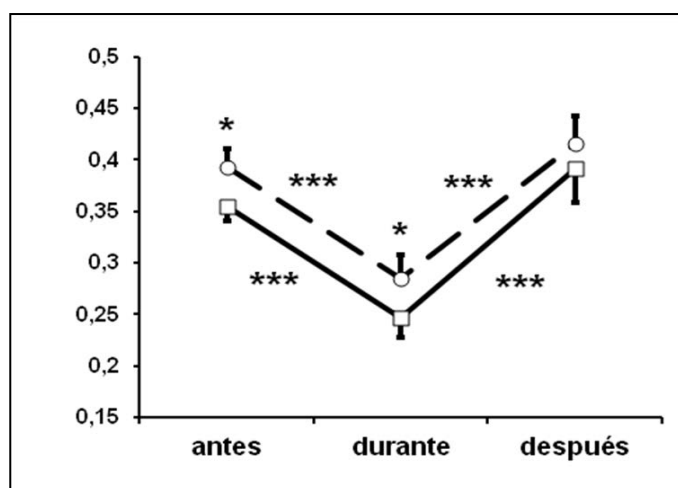
Frecuencia Respiratoria (rpm)



Presión Pleural (cmH₂O)



Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

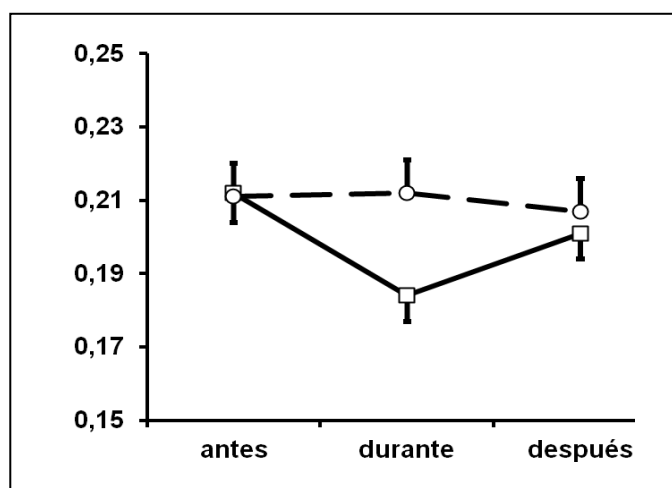
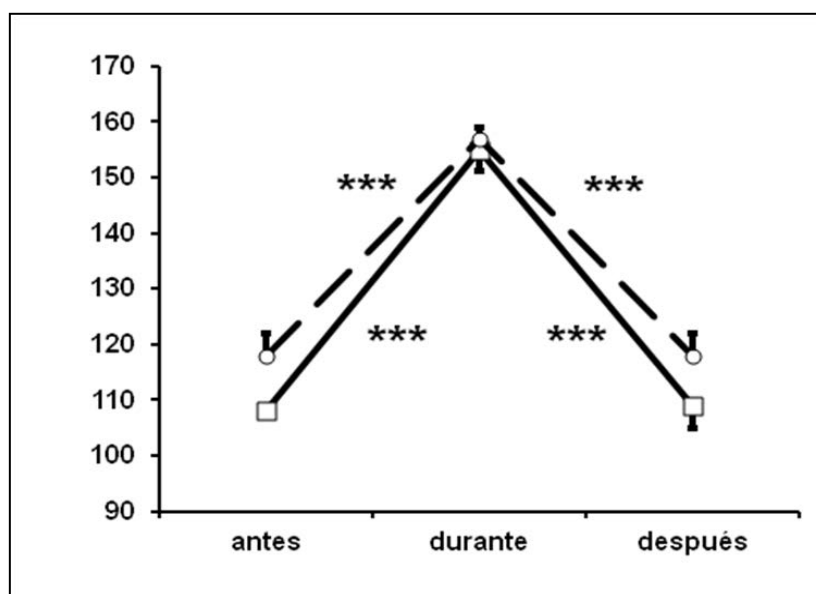


Figura 4.3.3. Cambios en los parámetros respiratorios promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPA_{dl}. Se representan, de arriba hacia abajo, frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPA_{dl} tras la microinyección de Muscimol en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Presión Arterial (mmHg)



Frecuencia Cardíaca (cpm)

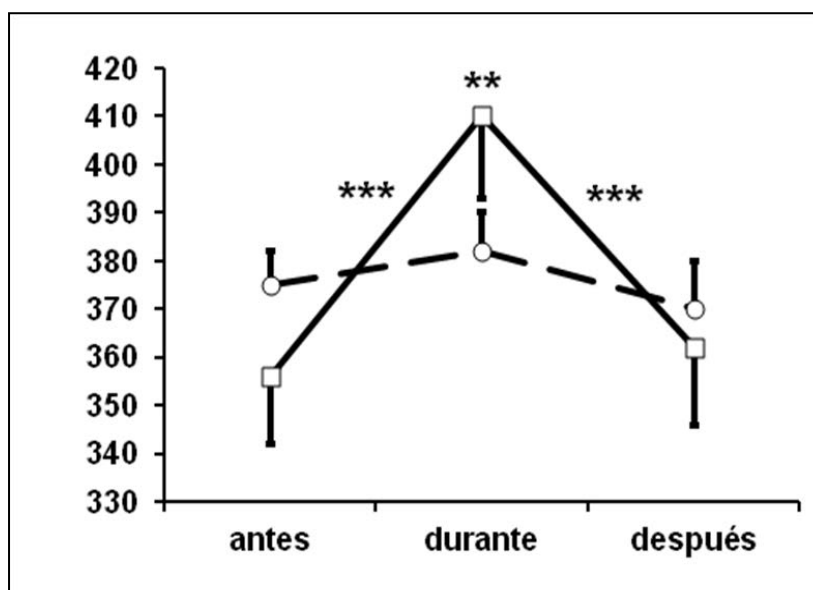
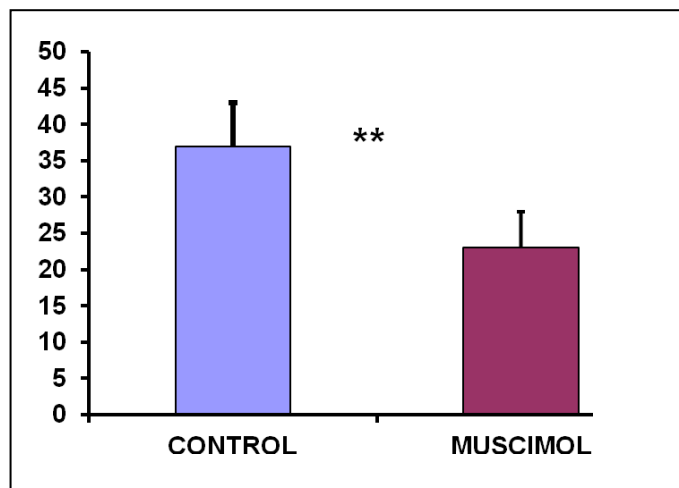


Figura 4.3.4. Cambios en la respuesta presora (arriba) y cardíaca (abajo) promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPAdl.

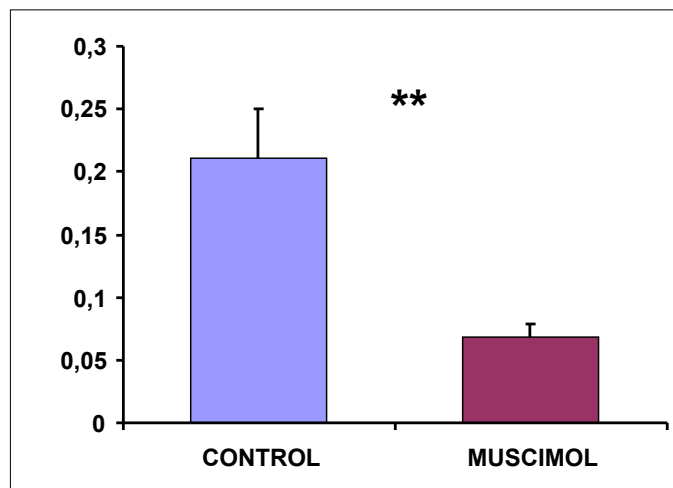
La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPAdl tras la microinyección de Muscimol en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

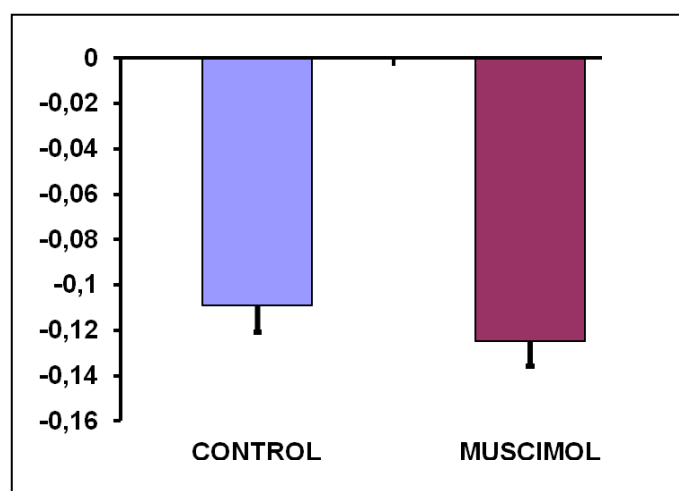
Frecuencia Respiratoria (rpm)



Presión Pleural (cmH₂O)



Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

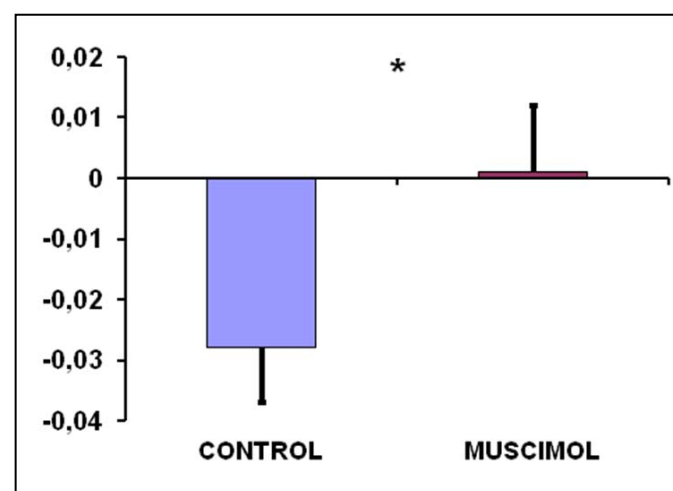


Figura 4.3.5. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de las variables respiratorias durante la estimulación eléctrica de la SGPAdI. Se representan de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, la frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

En azul se representa la estimulación control. En rojo se representa la estimulación de la SGPAdI tras la microinyección de Muscimol en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

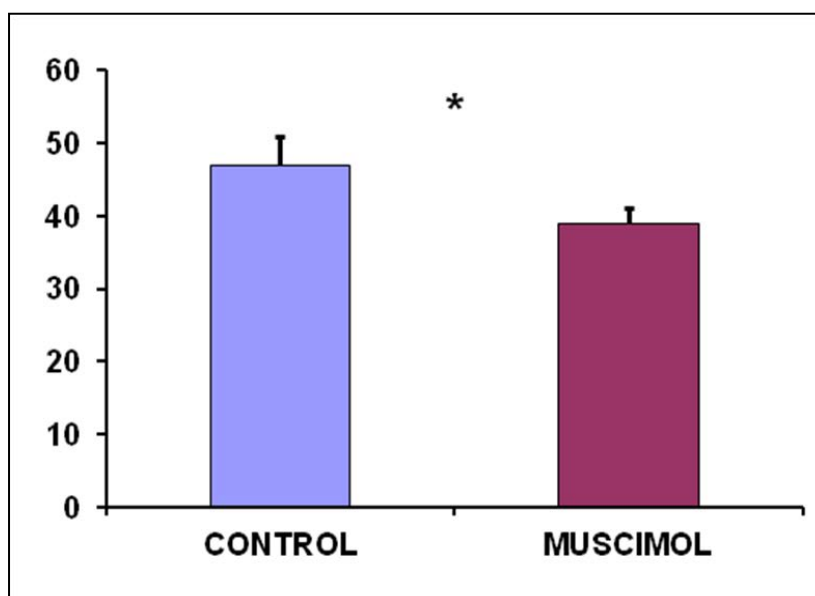
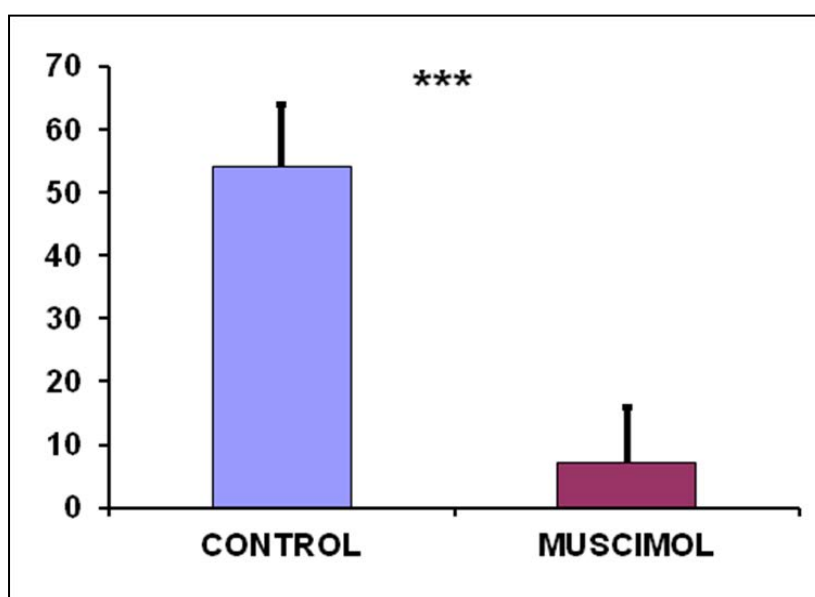
Presión Arterial (mmHg)**Frecuencia Cardiaca (cpm)**

Figura 4.3.6. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de la presión arterial (arriba) y frecuencia cardiaca (abajo) durante la estimulación eléctrica de la SGPAdI.

En azul se muestra la estimulación control y en rojo la estimulación de la SGPAdI tras microinyección de Muscimol en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media.

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Ti (s)	Ctrl	0.212 ± 0.01	0.184 ± 0.01	0.201 ± 0.01
	MUS	0.211 ± 0.01	0.212 ± 0.01	0.207 ± 0.01
Te (s)	Ctrl	0.355 ± 0.02	0.246 ± 0.02 ***	0.391 ± 0.03
	MUS	0.393 ± 0.02	0.285 ± 0.02 ***	0.416 ± 0.03
FR (rpm)	Ctrl	107 ± 4	143 ± 8 ***	104 ± 6
	MUS	101 ± 5	123 ± 7 ***	99 ± 5
PP(cmH ₂ O)	Ctrl	0.326 ± 0.02	0.534 ± 0.04 ***	0.339 ± 0.03
	MUS	0.321 ± 0.02	0.391 ± 0.03	0.316 ± 0.02

Tabla 4.3.I. Respuesta respiratoria evocada por estimulación de la SGPA_{dl} antes, durante y después de la microinyección de Muscimol en el Área A5. Se muestran los valores promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR) y presión pleural (PP).

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
PA (mmHg)	Ctrl	108 ± 1.4	155 ± 4 ***	109 ± 3.5
	MUS	118 ± 3.8	157 ± 2.4 ***	118 ± 3.7
FC (cpm)	Ctrl	356 ± 14	410 ± 17 ***	362 ± 16
	MUS	375 ± 7	382 ± 8	370 ± 10

Tabla 4.3.II. Respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPA_{dl} antes, durante y después de la microinyección de Muscimol en el Área A5. Se muestran los valores promediados de presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Todos los datos se muestran como media ± el error estándar de la media. Los valores de p son: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	Ti (s)	Te (s)	FR (rpm)	PP (cmH ₂ O)	PA (mmHg)	FC (cpm)
Control	- 0.028 ± 0.01	- 0.109 ± 0.01	37 ± 6	0.211 ± 0.04	47 ± 4	54 ± 10
MUS	0.001 ± 0.01 *	- 0.125 ± 0.01	23 ± 5 **	0.068 ± 0.01 **	39 ± 2 *	7 ± 9 ***

Tabla 4.3.III. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación de la SGPA_{dl} antes y después de la microinyección de Muscimol en el Área A5.
Se muestran los cambios en valores absolutos promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP) y presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

4.4. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de Kinurénico (50-100 nI, 5-10 nmol) en el Área A5 (8 ratas).

La respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes de la microinyección se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio, y aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca. Figuras 4.4.2A, 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5, 4.4.6; Tablas 4.4.I, 4.4.II y 4.4.III.

La localización de las zonas de microinyección se observa en la figura 4.4.1.

La microinyección de Kinurénico en el Área A5 (50-100 nI, 5-10 nmol, n=7) en 5 casos no produjo efectos cardiorrespiratorios (localizadas las cinco en pleno Área A5), en otros 2 casos produjo una respuesta bifásica de la presión arterial (localizadas en pleno Área A5), en uno de estos casos se acompaña de un ligero aumento y en el otro de una ligera disminución de frecuencia cardíaca.

Cuatro minutos después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 se produjo una disminución significativa de la frecuencia respiratoria de reposo (de 98 ± 4 a 85 ± 7 , $p < 0.05$) y del tiempo espiratorio de reposo (de 0.362 ± 0.02 a 0.480 ± 0.05 , $p < 0.01$). No se modifican significativamente la componente cardiovascular ni el tiempo inspiratorio.

Respuesta respiratoria

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5:

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria (de 85 ± 7 a 103 ± 4 rpm, $p < 0.01$) por disminución del tiempo espiratorio (de 0.480 ± 0.05 a 0.350 ± 0.02 s, $p < 0.01$). Esta respuesta era acompañada por un incremento de presión pleural inspiratoria (de 0.388 ± 0.04 a 0.516 ± 0.04 cmH₂O, $p < 0.05$). No se produjeron cambios en el tiempo inspiratorio (de 0.254 ± 0.01 a 0.241 ± 0.02 s). Figuras 4.4.2B, 4.4.3; Tabla 4.4.I.

El incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria es de 18 ± 5 rpm, este incremento se produjo por una disminución en valores absolutos del tiempo espiratorio de -0.131 ± 0.04 s. Los cambios en valores absolutos del tiempo inspiratorio son de -0.013 ± 0.02 s y de la presión pleural inspiratoria son de 0.128 ± 0.03 cmH₂O. Figura 4.4.5; Tabla 4.4.III.

Existen diferencias significativas en el incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria (de 31 ± 5 a 18 ± 5 rpm, $p < 0.05$). Figura 4.4.5; Tabla 4.4.III.

Respuesta cardiovascular

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica sustancialmente tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5. Se produce un menor incremento de presión

arterial y se abole prácticamente el incremento de frecuencia cardiaca evocado por estimulación eléctrica de la SGPdl.

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 se caracterizó por un incremento de presión arterial (de 103 ± 1 a 137 ± 6 mmHg, $p < 0.001$). No se produjeron cambios de frecuencia cardiaca (de 383 ± 15 a 380 ± 14 cpm). Figuras 4.4.2B, 4.4.4; Tabla 4.4.II.

Los cambios en valores absolutos de la presión arterial y frecuencia cardiaca son de 34 ± 5 mmHg y -3 ± 11 cpm respectivamente. Figura 4.4.6; Tabla 4.4.III.

Se produjo un menor incremento en valores absolutos de presión arterial (de 43 ± 3 a 34 ± 5 mmHg, $p < 0,05$) y de frecuencia cardiaca (de 39 ± 6 a -3 ± 11 cpm, $p < 0.01$). Figura 4.4.6; Tabla 4.4.III.

Otros resultados

Hay que señalar que son cinco los animales en los que la microinyección bilateral de Kinurénico provocó una depresión gradual de la frecuencia respiratoria, que finaliza con la muerte de los mismos (localización de la microinyección en el Área A5).

En otros 4 animales se microinyectó fuera de la zona de estudio. En uno de ellos, se produjo una ligera disminución de presión arterial y un ligero aumento de frecuencia respiratoria como consecuencia de la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de Kinurénico (la microinyección se localizó encima de la salida del nervio facial, 7n). Otro animal tuvo una disminución de presión arterial y de frecuencia cardiaca tras la estimulación de la SGPdl (localización de la microinyección en la

oliva lateral superior). Dos animales no sufrieron ningún cambio tras la estimulación de la SGPdl (localización de los puntos de microinyección en la zona del núcleo paraolivar superior y la oliva lateral superior, SPO y LSO; núcleo abducens accesorio y núcleo facial accesorio, Acs 6/7).

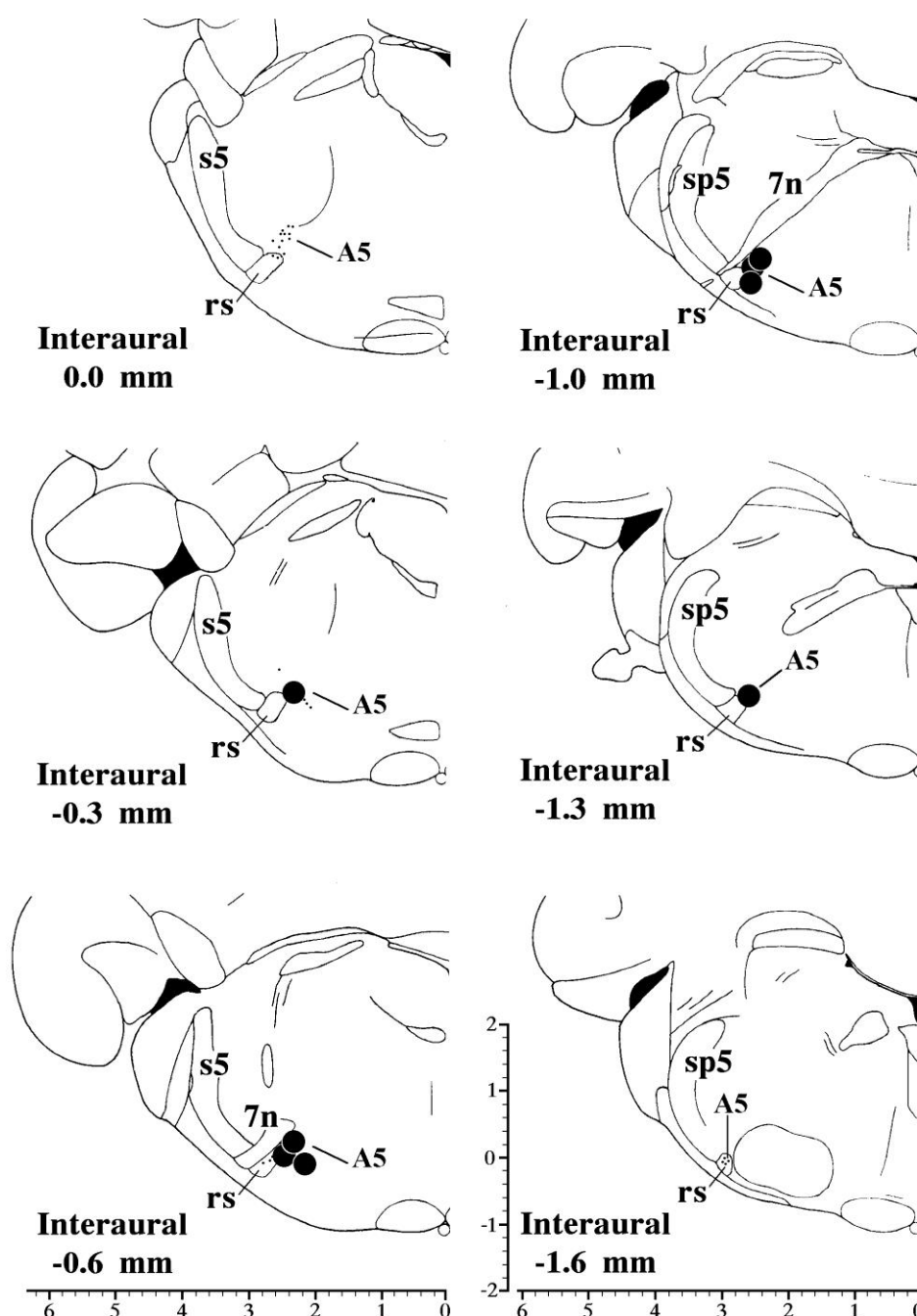


Figura 4.4.1. Esquematzación en secciones coroneles del Área A5 desde la porción rostral (parte superior izquierda) a la porción caudal (parte inferior derecha), que muestra la localización de las zonas de microinyección de Kinurénico en el Área A5.

(A5) Área A5 catecolaminérgica; (7n) nervio facial o raíz de este nervio; (rs) tracto rubroespinal; (s5) raíz sensorial del nervio trigémino; (sp5) tracto trigéminoespinal.

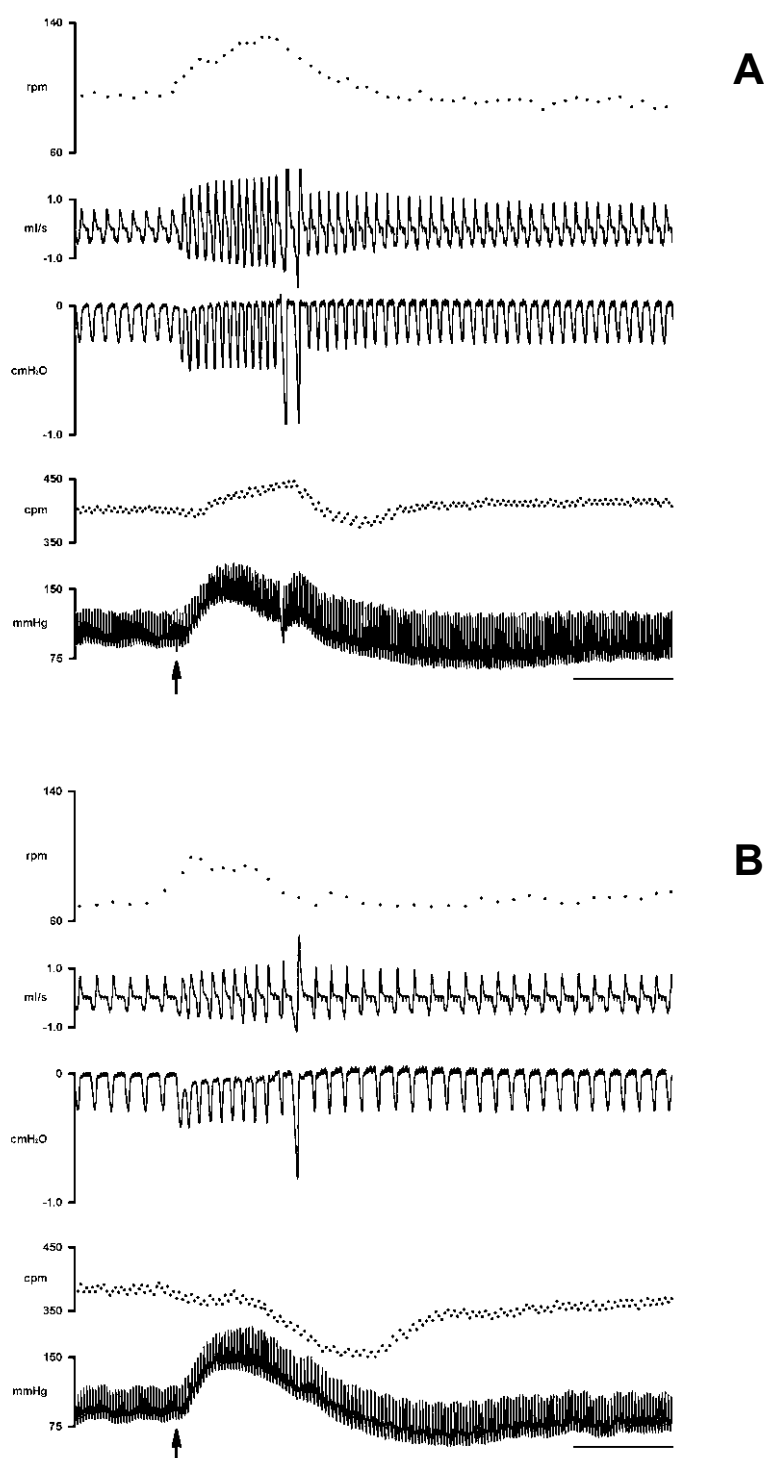
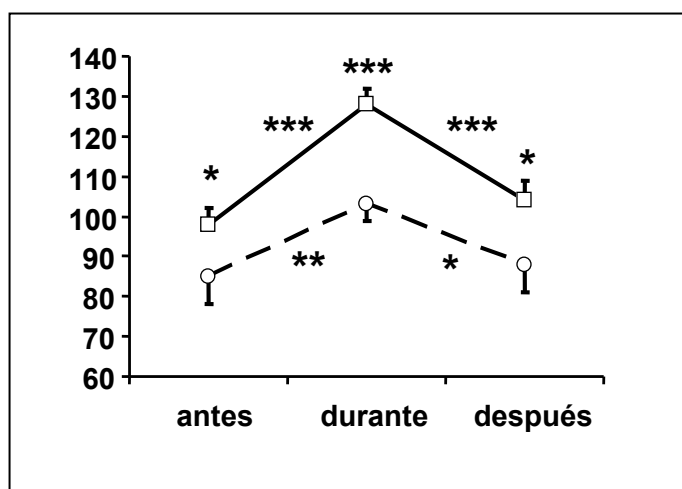
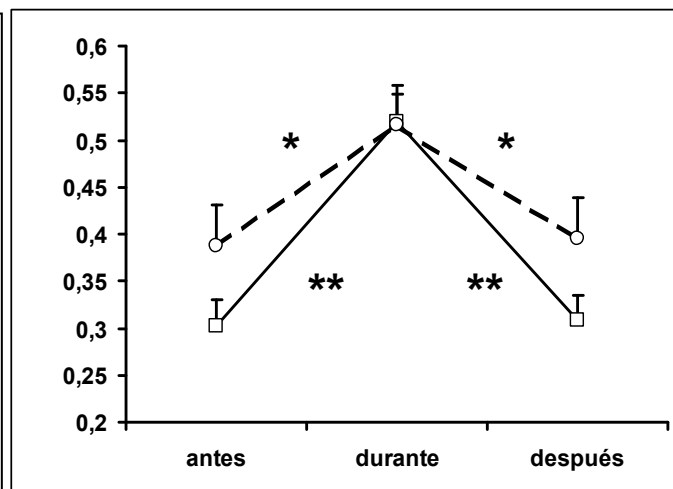


Figura 4.4.2. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación eléctrica de la SGPdI antes (a) y cuatro minutos después (b) de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 (flecha vertical hacia arriba). La estimulación eléctrica tiene una duración de cinco segundos. Se representan de arriba hacia abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea, flujo respiratorio, presión pleural, frecuencia cardíaca instantánea y presión arterial.

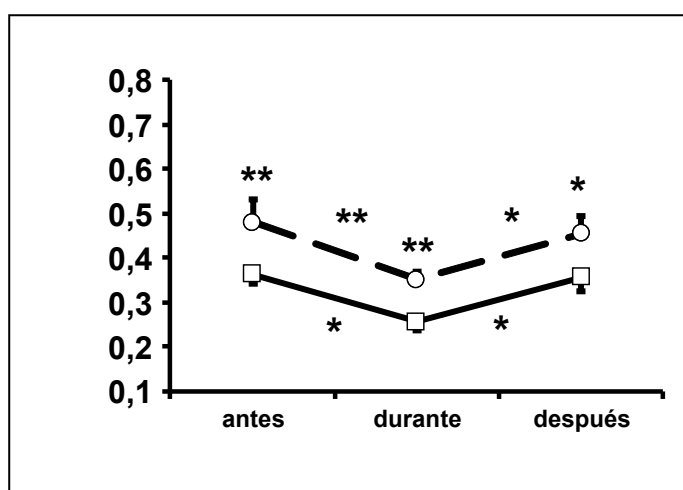
Frecuencia Respiratoria (rpm)



Presión Pleural (cmH₂O)



Tiempo espiratorio (s)



Tiempo inspiratorio (s)

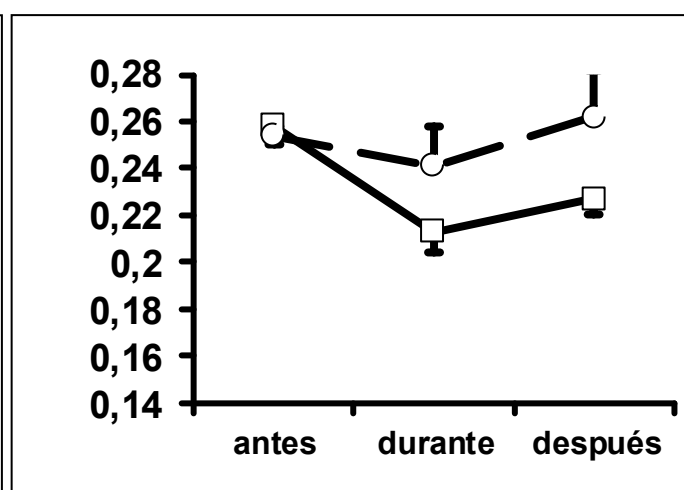


Figura 4.4.3. Cambios en los parámetros respiratorios promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdI. Se representan, de arriba hacia abajo, frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

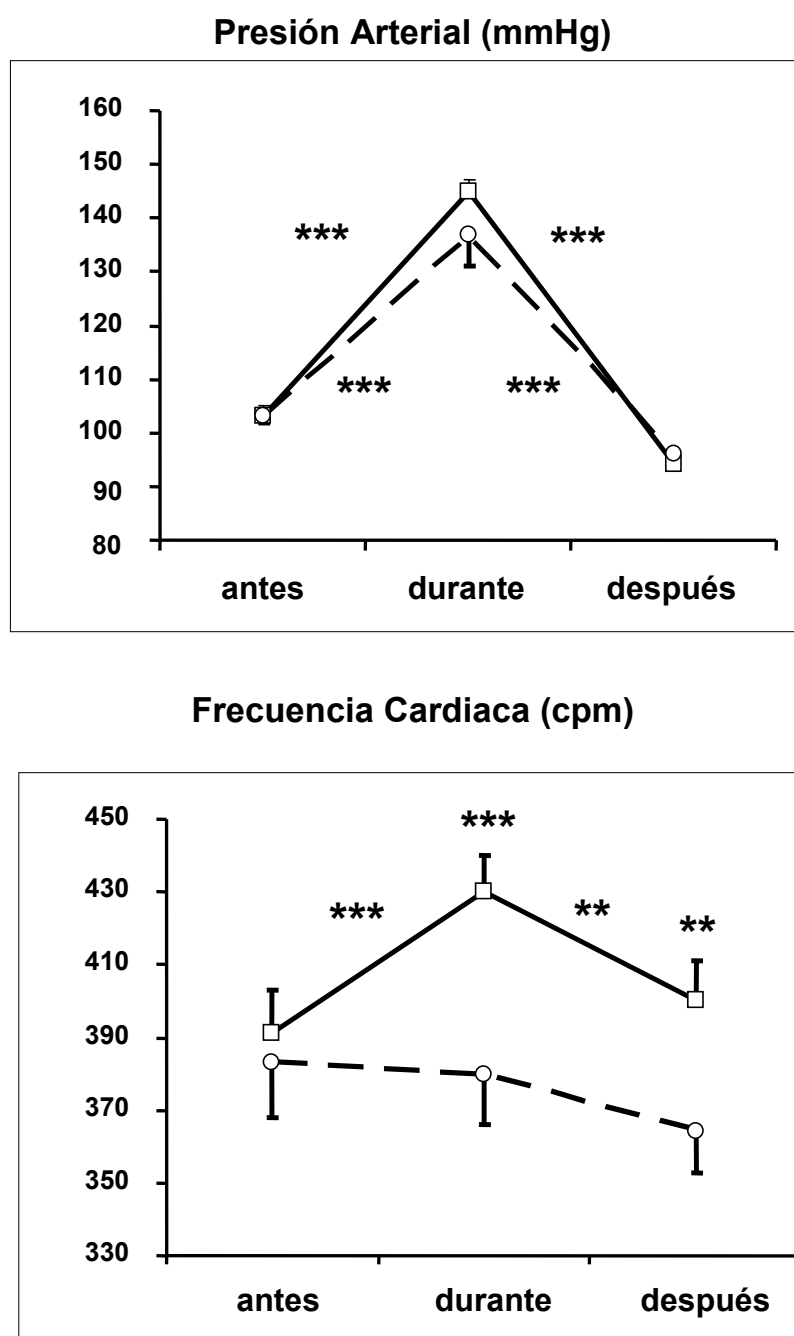
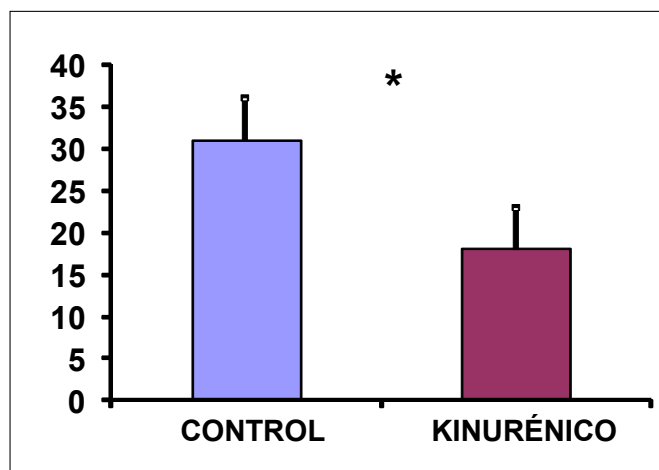
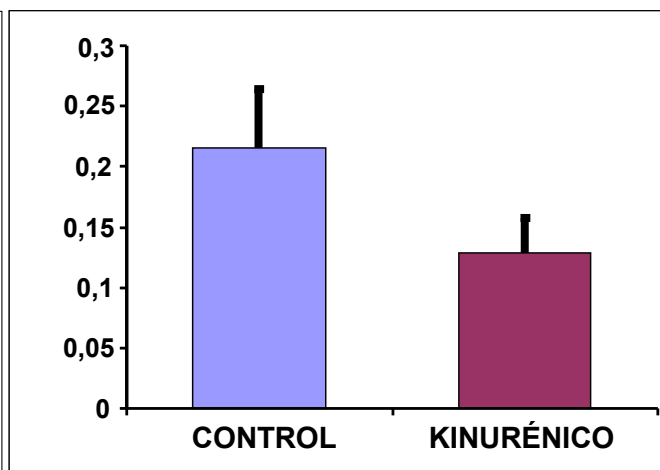


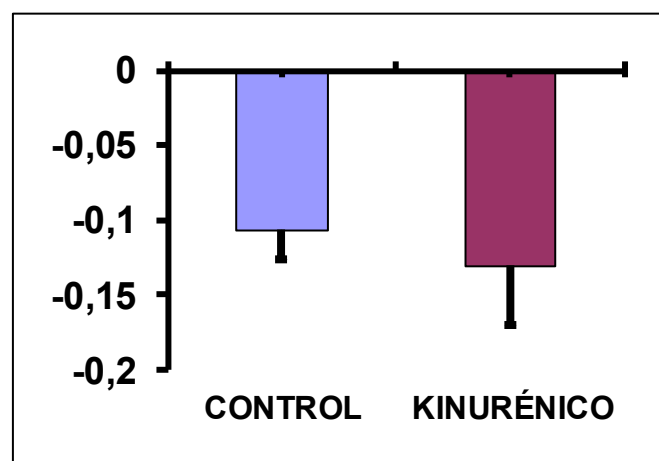
Figura 4.4.4. Cambios en la respuesta presora (arriba) y cardíaca (abajo) promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdl.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5. Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Frecuencia Respiratoria (rpm)

Presión Pleural (cmH₂O)

Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

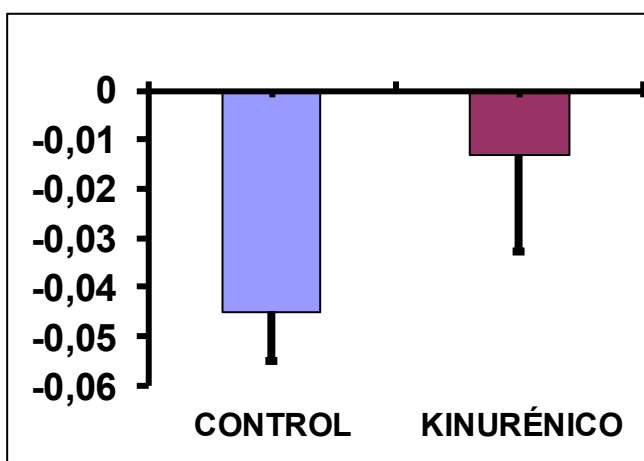


Figura 4.4.5. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de las variables respiratorias durante la estimulación eléctrica de la SGPdI. Se representan de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, la frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

En azul se representa la estimulación control. En rojo se representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

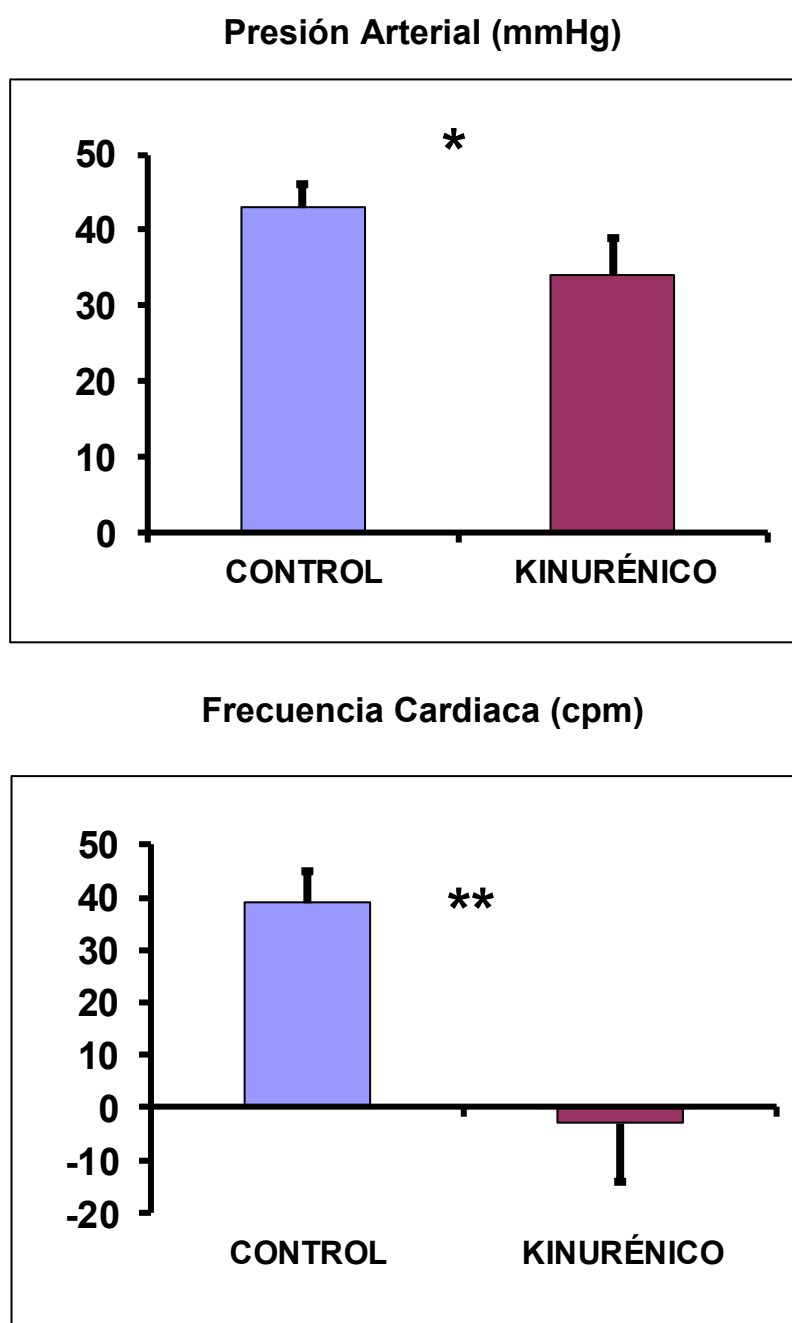


Figura 4.4.6. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de la presión arterial (arriba) y frecuencia cardíaca (abajo) durante la estimulación eléctrica de la SGPdl. En azul se muestra la estimulación control y en rojo la estimulación de la SGPdl tras microinyección de Kinurénico en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media.

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Ti (s)	Ctrl	0.258 ± 0.01	0.213 ± 0.01	0.227 ± 0.01
	KIN	0.254 ± 0.01	0.241 ± 0.02	0.262 ± 0.02
Te (s)	Ctrl	0.362 ± 0.02	0.255 ± 0.02 *	0.356 ± 0.03
	KIN	0.480 ± 0.05	0.350 ± 0.02 **	0.445 ± 0.04
FR (rpm)	Ctrl	98 ± 4	128 ± 4 ***	104 ± 5
	KIN	85 ± 7	103 ± 4 **	88 ± 7
PP(cmH ₂ O)	Ctrl	0.302 ± 0.03	0.519 ± 0.03 **	0.308 ± 0.03
	KIN	0.388 ± 0.04	0.516 ± 0.04 *	0.395 ± 0.04

Tabla 4.4.I. Respuesta respiratoria evocada por estimulación de la SGPdI antes, durante y después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5. Se muestran los valores promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR) y presión pleural (PP).

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
PA (mmHg)	Ctrl	103 ± 2	145 ± 2 ***	94 ± 2
	KIN	103 ± 1	137 ± 6 ***	96 ± 2
FC (cpm)	Ctrl	391 ± 12	430 ± 10 ***	400 ± 11
	KIN	383 ± 15	380 ± 14	364 ± 11

Tabla 4.4.II. Respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPdl antes, durante y después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5. Se muestran los valores promediados de presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

Todos los datos se muestran como media ± el error estándar de la media. Los valores de p son: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	Ti (s)	Te (s)	FR (rpm)	PP (cmH ₂ O)	PA (mmHg)	FC (cpm)
Control	-0.045 ± 0.01	- 0.108 ± 0.02	31 ± 5	0.216 ± 0.05	43 ± 3	39 ± 6
KIN	-0.013 ± 0.02	- 0.131 ± 0.04	18 ± 5 *	0.128 ± 0.03	34 ± 5 *	-3 ± 11 **

Tabla 4.4.III. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación de la SGPdl antes y después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5.
Se muestran los cambios en valores absolutos promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

4.5. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de DAP5 en el A5

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de DAP5 (50-100 nl, 50-100 nmol) en el Área A5 (7 ratas).

La respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio, incremento de la presión pleural inspiratoria y aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca. Figuras 4.5.2A, 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5, 4.5.6; Tablas 4.5.I, 4.5.II y 4.5.III.

La localización de las zonas de microinyección se observa en la figura 4.5.1.

La microinyección de DAP5 en el Área A5 (50-100 nl, 50-100 nmol, n=7) produjo, en todos animales se produjo un aumento sostenido de la presión arterial que se acompañó de un aumento de frecuencia cardíaca. En dos casos se acompañó de apnea (localización en pleno Área A5) y, en otro se acompañó de disminución de frecuencia respiratoria y de flujos (localización en pleno Área A5).

Cuatro minutos después de la microinyección de DAP5 en el Área A5 no se producen cambios significativos en los niveles de reposo de las variables cardiorrespiratorias. Figura 4.5.3; Tabla 4.5.I.

Respuesta respiratoria

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl no se modifica tras la microinyección de DAP5 en el Área A5:

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de DAP5 en el Área A5 se caracterizó por un incremento significativo de frecuencia respiratoria (de 90 ± 5 a 112 ± 3 rpm, $p < 0.01$) por disminución significativa del tiempo espiratorio (de 0.398 ± 0.04 a 0.290 ± 0.02 s, $p < 0.05$). Esta respuesta era acompañada por un incremento de presión pleural inspiratoria (de 0.356 ± 0.02 a 0.569 ± 0.04 cmH₂O, $p < 0.001$). Figuras 4.5.2B, 4.5.3: Tabla 4.5.I.

El incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria es de 22 ± 7 rpm, este incremento se produjo por una disminución en valores absolutos del tiempo espiratorio de -0.108 ± 0.02 s. Los cambios en valores absolutos del tiempo inspiratorio son de -0.039 ± 0.05 s y de presión pleural inspiratoria son de 0.214 ± 0.05 cmH₂O. Figura 4.5.5; Tabla 4.5.III.

No existen diferencias en los cambios en valores absolutos de ninguna de las variables respiratorias registradas con respecto al control: frecuencia respiratoria (de 30 ± 5 a 22 ± 7 rpm), presión pleural inspiratoria (de 0.22 ± 0.05 a 0.214 ± 0.05 cmH₂O), tiempo espiratorio (de -0.124 ± 0.01 a -0.108 ± 0.02 s) e inspiratorio (de -0.039 ± 0.02 a -0.039 ± 0.05 s). Figura 4.5.5; Tabla 4.5.III.

Respuesta cardiovascular

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de DAP5 en el Área A5. Se produce un menor incremento de presión arterial y de frecuencia cardíaca evocado por estimulación de la SGPdl:

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de DAP5 en el Área A5 se caracterizó por un incremento de presión arterial (de 113 ± 5 a 174 ± 7 mmHg, $p < 0.001$) y de frecuencia cardíaca (de 369 ± 14 a 377 ± 15 cpm). Figuras 4.5.2b, 4.5.4; Tabla 4.5.II.

Los cambios en valores absolutos de la presión arterial y frecuencia cardíaca son de 61 ± 3 mmHg y 9 ± 7 cpm respectivamente. Figura 4.5.6; Tabla 4.5.III.

Se produjo un menor incremento en valores absolutos de presión arterial (de 70 ± 4 a 61 ± 3 mmHg, $p < 0.05$) y de la frecuencia cardíaca (de 41 ± 7 a 9 ± 7 cpm, $p < 0.01$). Figura 4.5.6; Tabla 4.5.III.

Otros resultados

En tres animales, tras la microinyección bilateral de DAP5 se produce una depresión gradual de la frecuencia respiratoria, que finaliza con la muerte de los mismos (localización de la microinyección en el Área A5).

En otros 2 animales se microinyectó fuera de la zona de estudio. En uno de ellos se produjo una ligera disminución de presión arterial tras

la estimulación de la SGPdl (localización entre las zonas del núcleo sensorial principal del trigémino parte ventrolateral – tracto espinal del trigémino, Pr5VL-Sp5). En otros animal no se produjeron cambios tras la estimulación de la SGPdl (localización de los puntos de microinyección en la zona del núcleo paraolivar superior y la oliva lateral superior, SPO y LSO; oliva lateral superior respectivamente).

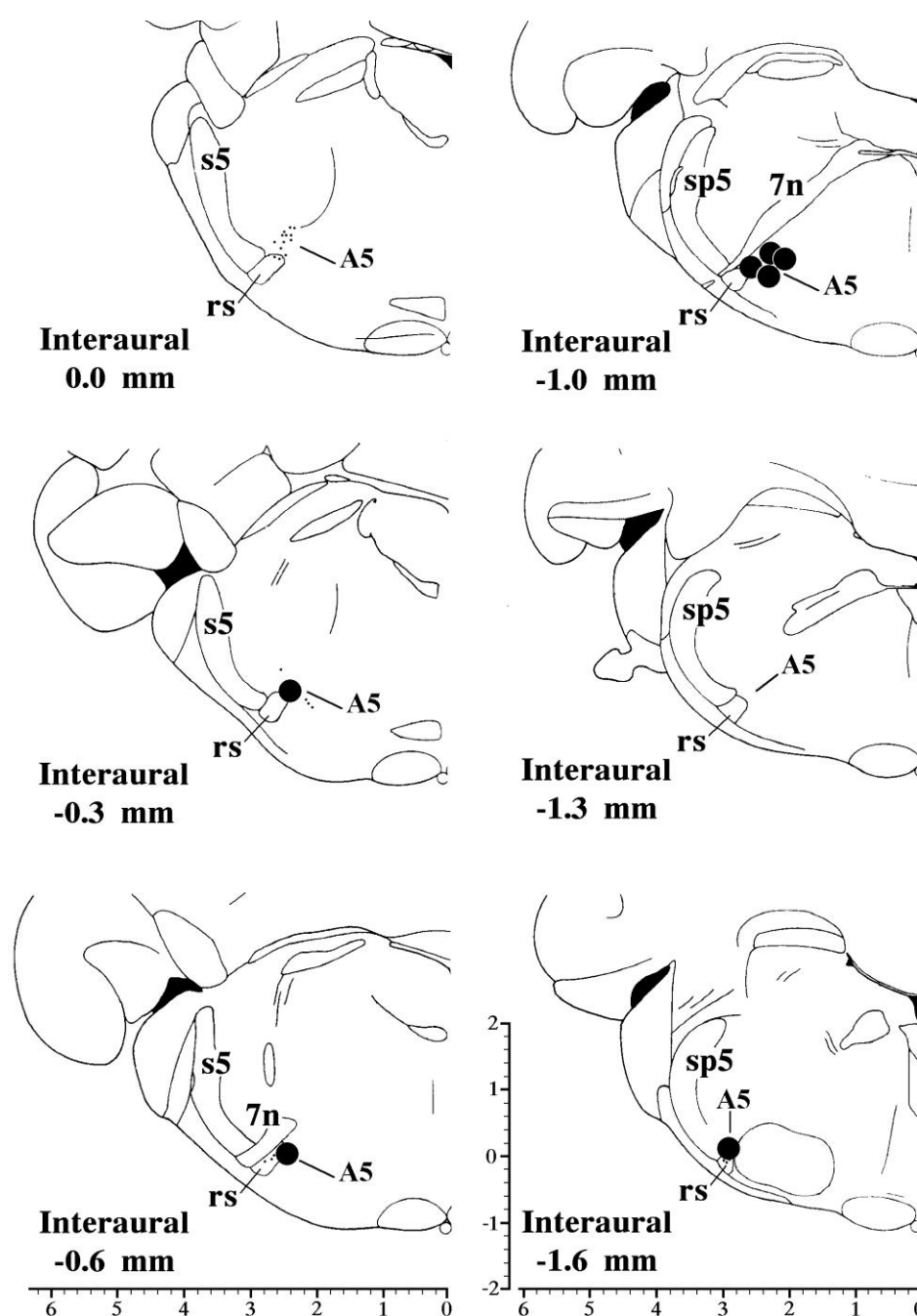


Figura 4.5.1. Esquematzación en secciones coronales del Área A5 desde la porción rostral (parte superior izquierda) a la porción caudal (parte inferior derecha), que muestra la localización de las zonas de microinyección de DAP5 en el Área A5.

(A5) Área A5 catecolaminérgica; (7n) nervio facial o raíz de este nervio; (rs) tracto rubroespinal; (s5) raíz sensorial del nervio trigémino; (sp5) tracto trigéminoespinal.

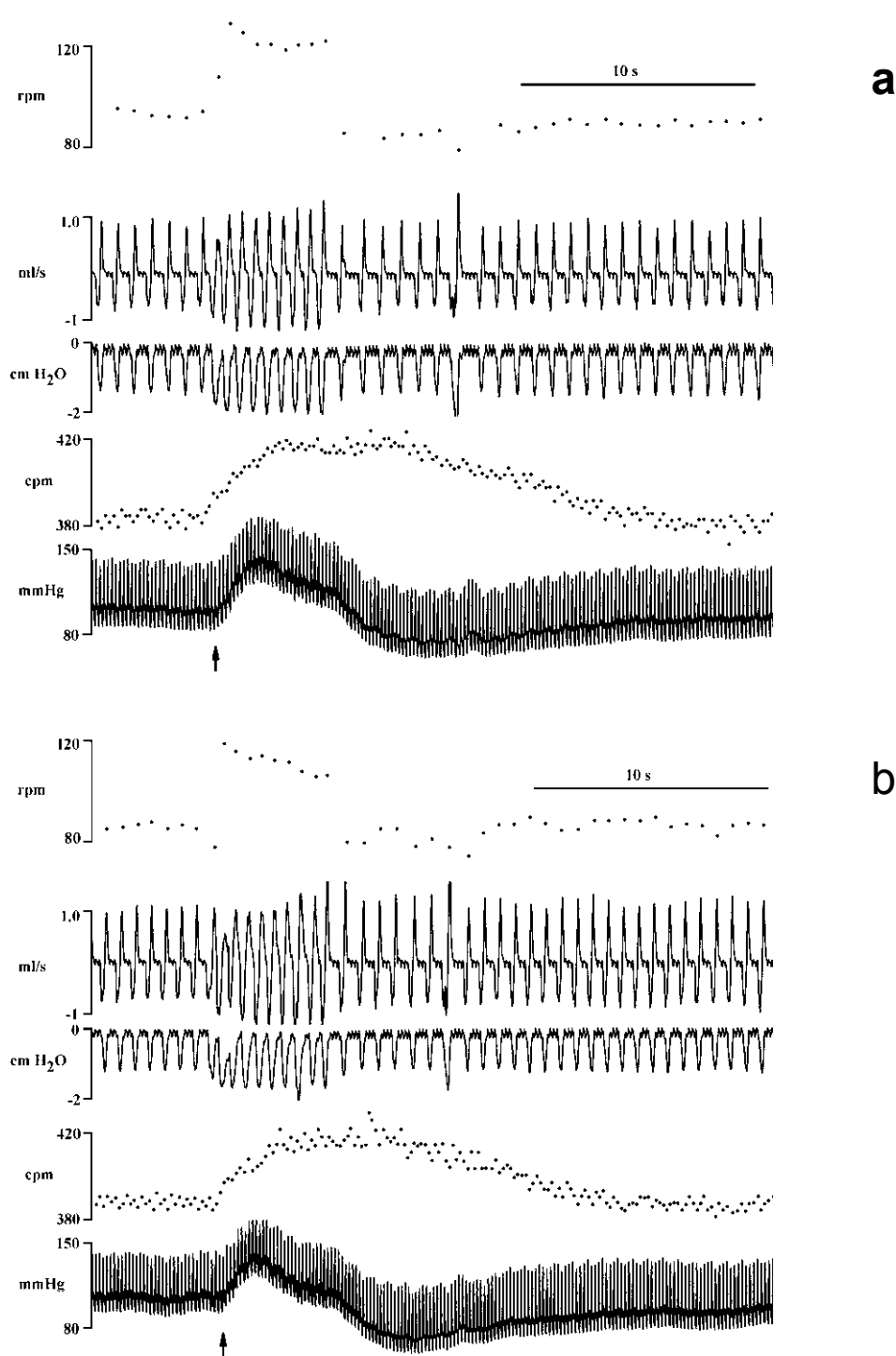
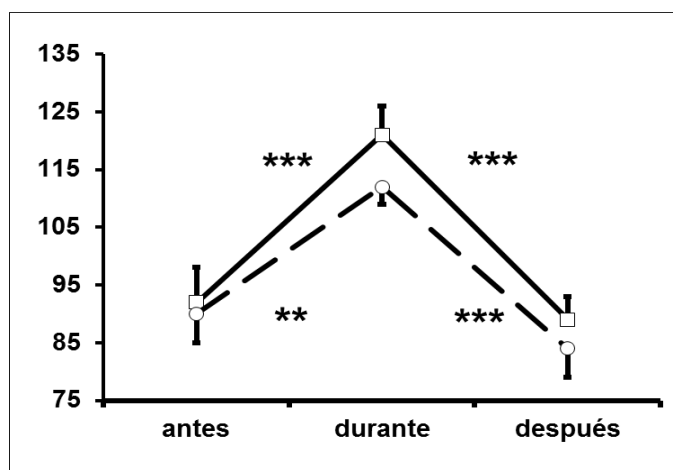
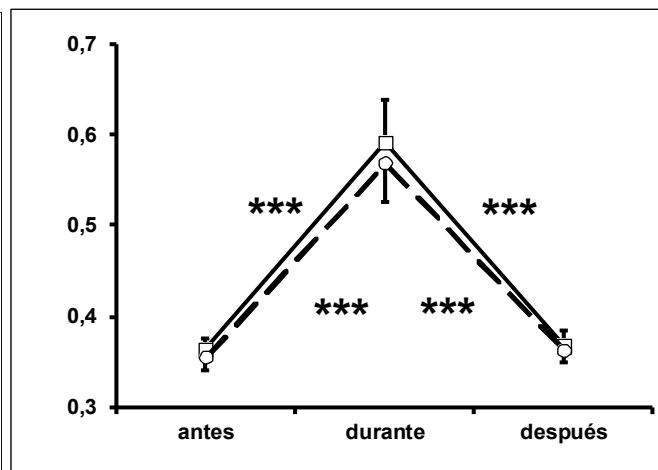


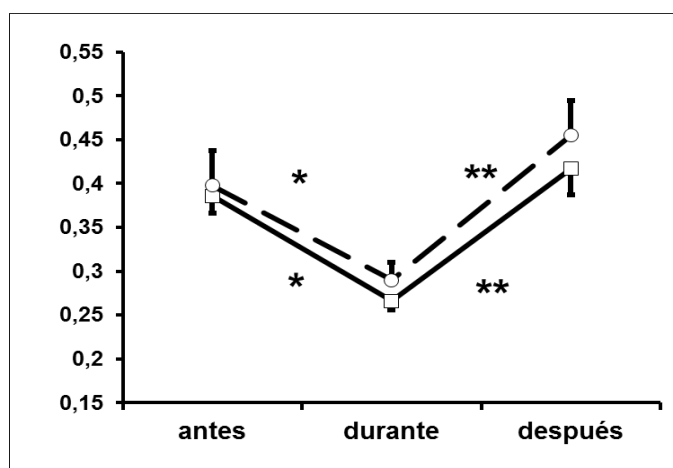
Figura 4.5.2. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación eléctrica de la SGPdI antes (a) y cuatro minutos después (b) de la microinyección de DAP5 en el Área A5 (flecha vertical hacia arriba). La estimulación eléctrica tiene una duración de cinco segundos.

Se representan de arriba hacia abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea, flujo respiratorio, presión pleural, frecuencia cardíaca instantánea y presión arterial.

Frecuencia Respiratoria (rpm)

Presión Pleural (cmH₂O)

Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

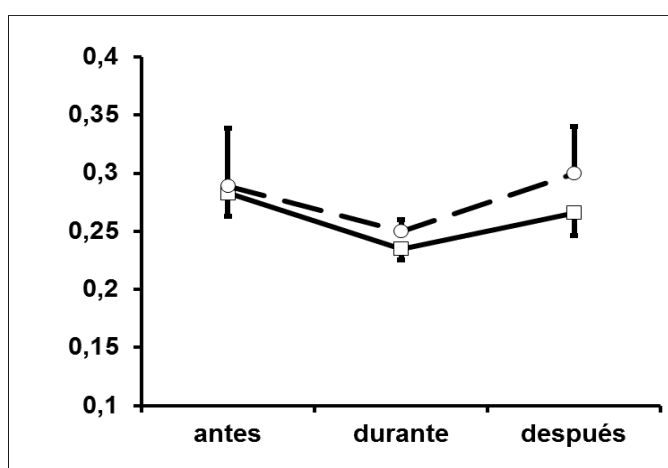
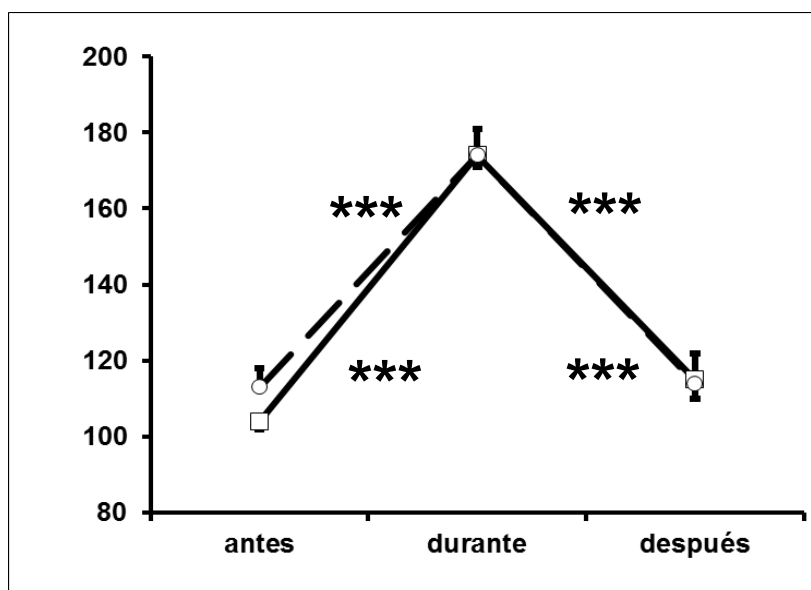


Figura 4.5.3. Cambios en los parámetros respiratorios promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdI. Se representan, de arriba hacia abajo, frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de DAP5 en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Presión Arterial (mmHg)



Frecuencia Cardiaca (cpm)

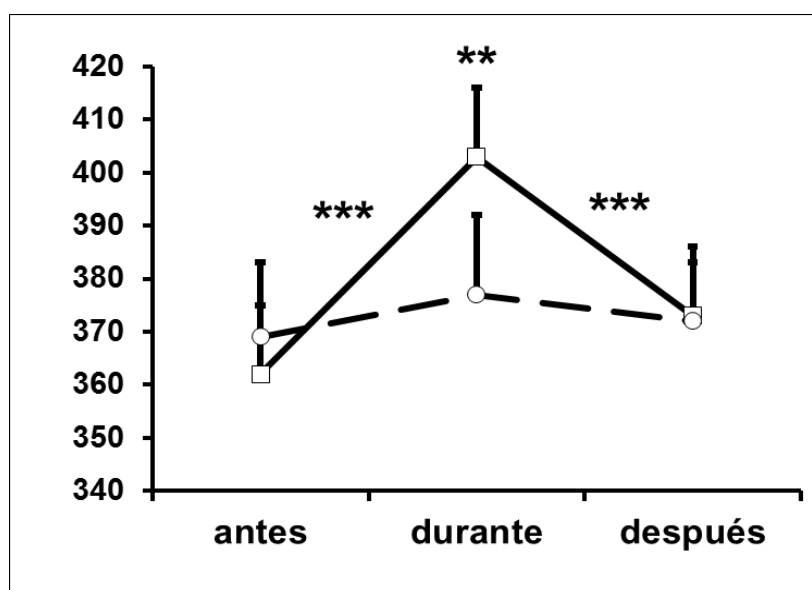


Figura 4.5.4. Cambios en la respuesta presora (arriba) y cardiaca (abajo) promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdI.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de DAP5 en el Área A5. Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

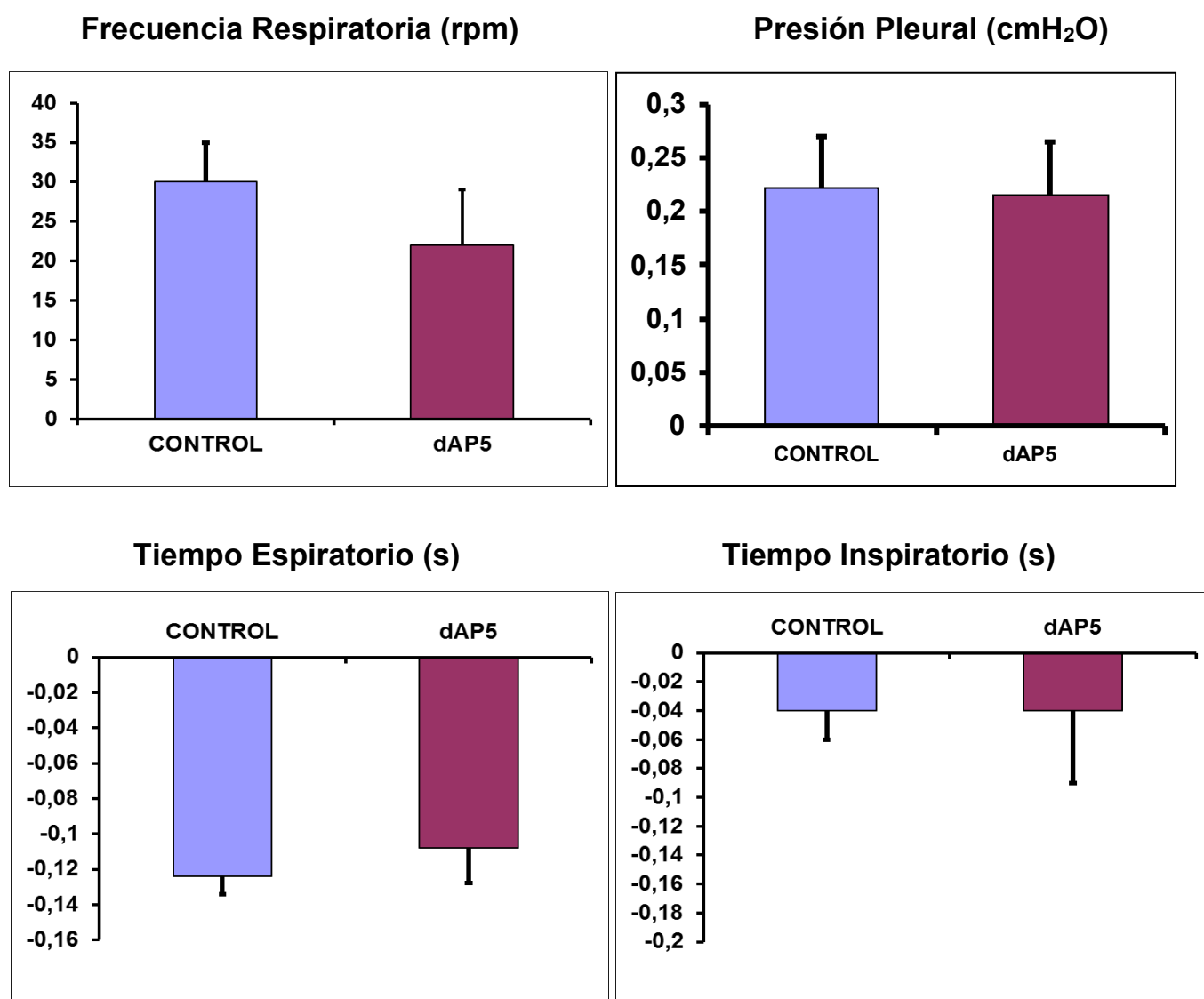


Figura 4.5.5. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de las variables respiratorias durante la estimulación eléctrica de la SGPdI.

Se representan de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, la frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

En azul se representa la estimulación control. En rojo se representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de DAP5 en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

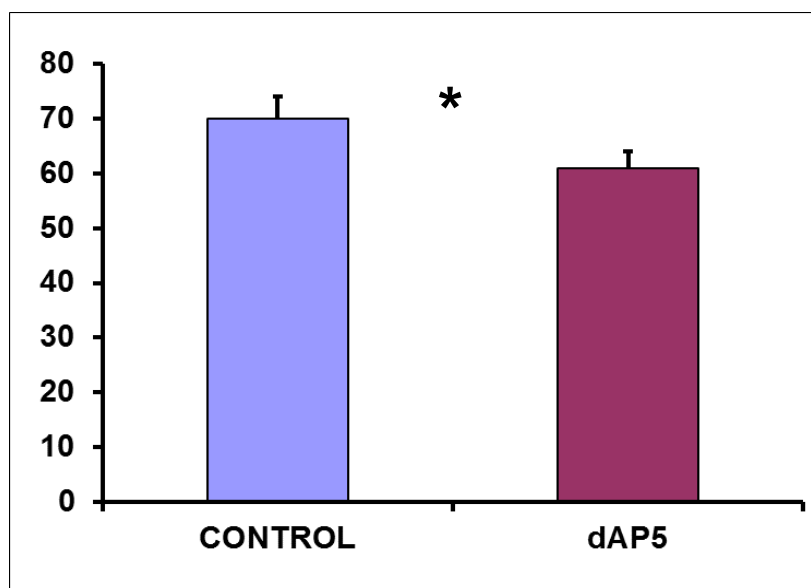
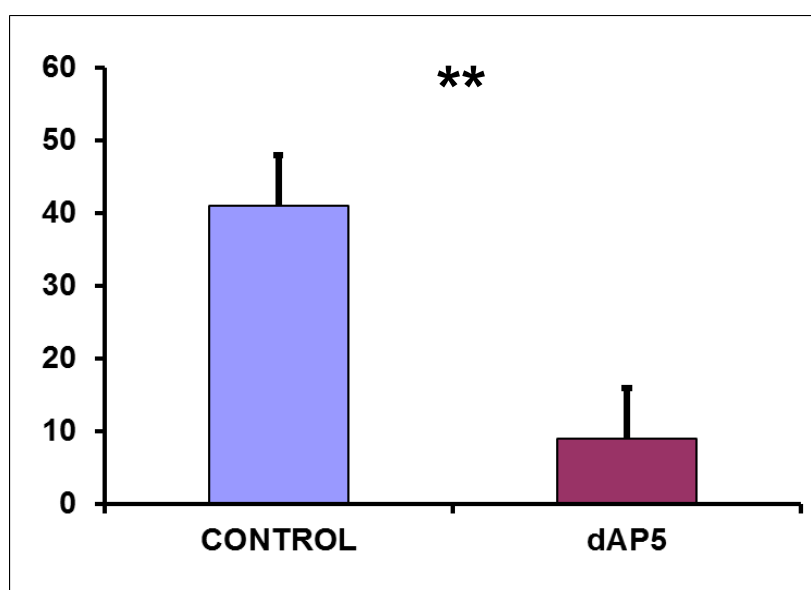
Presión Arterial (mmHg)**Frecuencia Cardíaca (cpm)**

Figura 4.5.6. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de la presión arterial (arriba) y frecuencia cardíaca (abajo) durante la estimulación eléctrica de la SGPdl.

En azul se muestra la estimulación control y en rojo la estimulación de la SGPdl tras microinyección de DAP5 en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media.

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Ti (s)	Ctrl	0.283 ± 0.02	0.235 ± 0.01	0.266 ± 0.01
	DAP5	0.289 ± 0.05	0.250 ± 0.02	0.300 ± 0.04
Te (s)	Ctrl	0.386 ± 0.02	0.266 ± 0.01 *	0.417 ± 0.02
	DAP5	0.398 ± 0.04	0.290 ± 0.02 *	0.455 ± 0.04
FR (rpm)	Ctrl	92 ± 6	121 ± 5 ***	89 ± 4
	DAP5	90 ± 5	112 ± 3 **	84 ± 5
PP(cmH ₂ O)	Ctrl	0.365 ± 0.01	0.591 ± 0.05 ***	0.369 ± 0.01
	DAP5	0.356 ± 0.02	0.569 ± 0.04 ***	0.363 ± 0.01

Tabla 4.5.I. Respuesta respiratoria evocada por estimulación de la SGPdI antes, durante y después de la microinyección de DAP5 en el Área A5. Se muestran los valores promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR) y presión pleural (PP).

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
PA (mmHg)	Ctrl	104 ± 2	174 ± 3 ***	115 ± 5
	DAP5	113 ± 5	174 ± 7 ***	114 ± 8
FC (cpm)	Ctrl	362 ± 20	403 ± 13 ***	373 ± 16
	DAP5	369 ± 14	377 ± 15	372 ± 11

Tabla 4.5.II. Respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPdl antes, durante y después de la microinyección de DAP5 en el Área A5. Se muestran los valores promediados de presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Todos los datos se muestran como media ± el error estándar de la media. Los valores de p son: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	Ti (s)	Te (s)	FR (rpm)	PP (cmH ₂ O)	PA (mmHg)	FC (cpm)
Control	-0.039 ± 0.02	-0.124 ± 0.01	30 ± 5	0.222 ± 0.05	70 ± 4	41 ± 7
DAP5	-0.039 ± 0.05	-0.108 ± 0.02	22 ± 7	0.214 ± 0.05	61 ± 3 *	9 ± 7 **

Tabla 4.5.III. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación de la SGPdl antes y después de la microinyección de DAP5 en el Área A5. Se muestran los cambios en valores absolutos promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

4.6. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de CNQX en el Área A5

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de CNQX (1M) en el Área A5 (8 ratas).

La respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio, incremento de la presión pleural inspiratoria y aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca. Figuras 4.6.2A, 4.6.3, 4.6.4, 4.6.5, 4.6.6; Tablas 4.6.I, 4.6.II y 4.6.III.

La localización de las zonas de microinyección se observa en la figura 4.6.1.

La microinyección de CNQX en el Área A5 (50-100 nl, 50-100 nmol, n=7) produjo en todos los animales un aumento sostenido de presión arterial y taquicardia. En dos casos se observó taquipnea, en tres apnea y en otros dos no hay cambios respiratorios.

Tras cuatro minutos de la microinyección de CNQX en el Área A5 se produjo un incremento significativo de la presión arterial (de 106 ± 3 a 128 ± 4 mmHg, $p < 0.001$) y de la frecuencia cardíaca de reposo (de 323 ± 10 a 350 ± 8 cpm, $p < 0.001$). Se produce una disminución no significativa de la frecuencia respiratoria de reposo (de 109 ± 5 a 98 ± 5 rpm), debido a un aumento significativo del tiempo espiratorio de reposo (de 0.345 ± 0.01 a 0.437 ± 0.04 s, $p < 0.001$). Figuras 4.6.3; Tablas 4.6.I y 4.6.II.

Respuesta respiratoria

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de CNQX en el Área A5

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de CNQX en el Área A5 se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria (de 98 ± 5 a 122 ± 6 rpm, $p < 0.001$) por disminución del tiempo espiratorio (de 0.437 ± 0.04 a 0.315 ± 0.02 s, $p < 0.001$) e incremento de presión pleural inspiratoria (de 0.403 ± 0.02 a 0.648 ± 0.05 cmH₂O, $p < 0.001$). No se produjeron cambios en el tiempo inspiratorio (de 0.187 ± 0.01 a 0.186 ± 0.01 s). Figuras 4.6.2B, 4.6.3; Tabla 4.6.I.

El incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria es de 24 ± 3 rpm, este incremento se produjo por una disminución en valores absolutos del tiempo espiratorio de 0.122 ± 0.02 s. Los cambios en valores absolutos del tiempo inspiratorio es de 0.005 ± 0.009 s y de presión pleural 0.245 ± 0.05 . Figura 4.6.5; Tabla 4.6.III.

Hubo cambios significativos en el incremento en valores absolutos de frecuencia respiratoria (de 32 ± 4 a 24 ± 3 rpm, $p < 0.01$). No hubo cambios significativos en los valores absolutos de tiempo espiratorio (de 0.101 ± 0.01 a 0.122 ± 0.02 s) de tiempo inspiratorio (de 0.026 ± 0.01 a 0.005 ± 0.009 s) y de presión pleural inspiratoria (de 0.251 ± 0.05 a 0.245 ± 0.05 cmH₂O). Figura 4.6.5; Tabla 4.6.III.

Respuesta cardiovascular

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de SGPdl se modifica tras la microinyección de CNQX en el Área A5. Se produce un menor incremento de presión arterial y de frecuencia cardíaca tras la microinyección de CNQX en el Área A5:

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl 4 minutos después de la microinyección de CNQX en el Área A5 se caracterizó por un incremento de la presión arterial (de 128 ± 4 a 172 ± 4 mmHg, $p < 0.001$) y un aumento significativo de la frecuencia cardíaca (de 350 ± 8 a 368 ± 6 cpm, $p < 0.01$). Figuras 4.6.2b, 4.6.4; Tabla 4.6.II.

Los cambios en valores absolutos de la presión arterial y frecuencia cardíaca son de 44 ± 4 mmHg y 18 ± 4 cpm respectivamente. Figura 4.6.6; Tabla 4.6.III.

Se produjo un menor incremento en valores absolutos de presión arterial (de 51 ± 4 a 44 ± 4 mmHg, $p < 0.05$) y frecuencia cardíaca (de 37 ± 5 a 18 ± 4 cpm, $p < 0.001$). Figura 4.6.6; Tabla 4.6.III.

Otros resultados

En tres animales, tras la microinyección bilateral de CNQX se produce una depresión gradual de la frecuencia respiratoria, que finaliza con la muerte de los mismos (localización de la microinyección en el Área A5).

En otros dos animales se microinyectó fuera de la zona de estudio. En uno de ellos se produjo una ligera disminución de presión arterial y frecuencia respiratoria tras la estimulación de la SGPdl (localización entre

las zonas del núcleo sensorial principal del trigémino parte ventrolateral – nervio facial, Pr5VL-7n). En el otro animal no se produjeron cambios tras la estimulación de la SGPdl (localización de la microinyección en la zona del núcleo sensorial principal del trigémino parte ventrolateral- sensorial principal del trigémino parte dorsomedial, Pr5VL-Pr5DM).

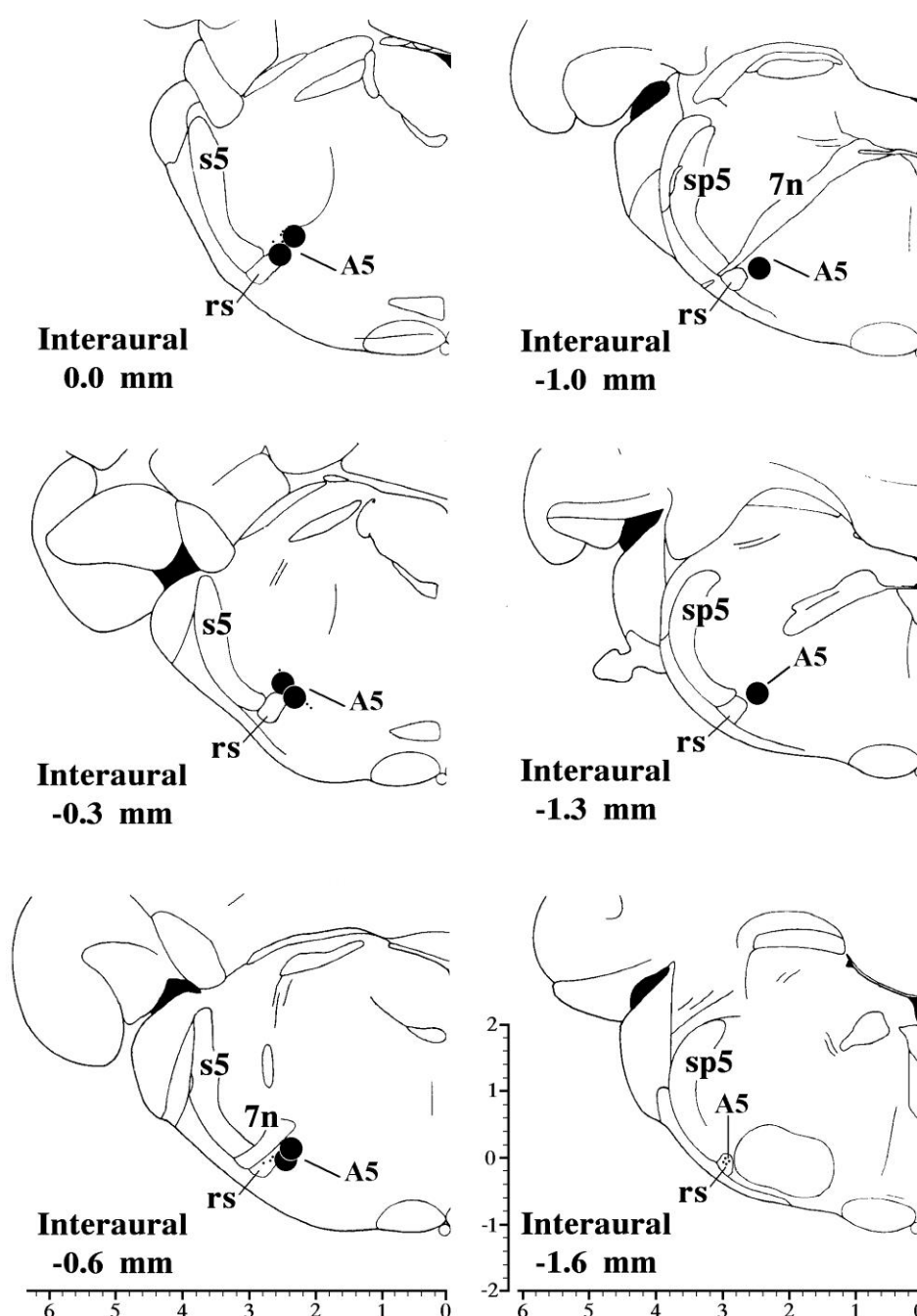


Figura 4.6.1. Esquematzación en secciones coronales del Área A5 desde la porción rostral (parte superior izquierda) a la porción caudal (parte inferior derecha), que muestra la localización de las zonas de microinyección de CNQX en el Área A5. (A5) Área A5 catecolaminérgica; (7n) nervio facial o raíz de este nervio; (rs) tracto rubroespinal; (s5) raíz sensorial del nervio trigémino; (sp5) tracto trigéminoespinal.

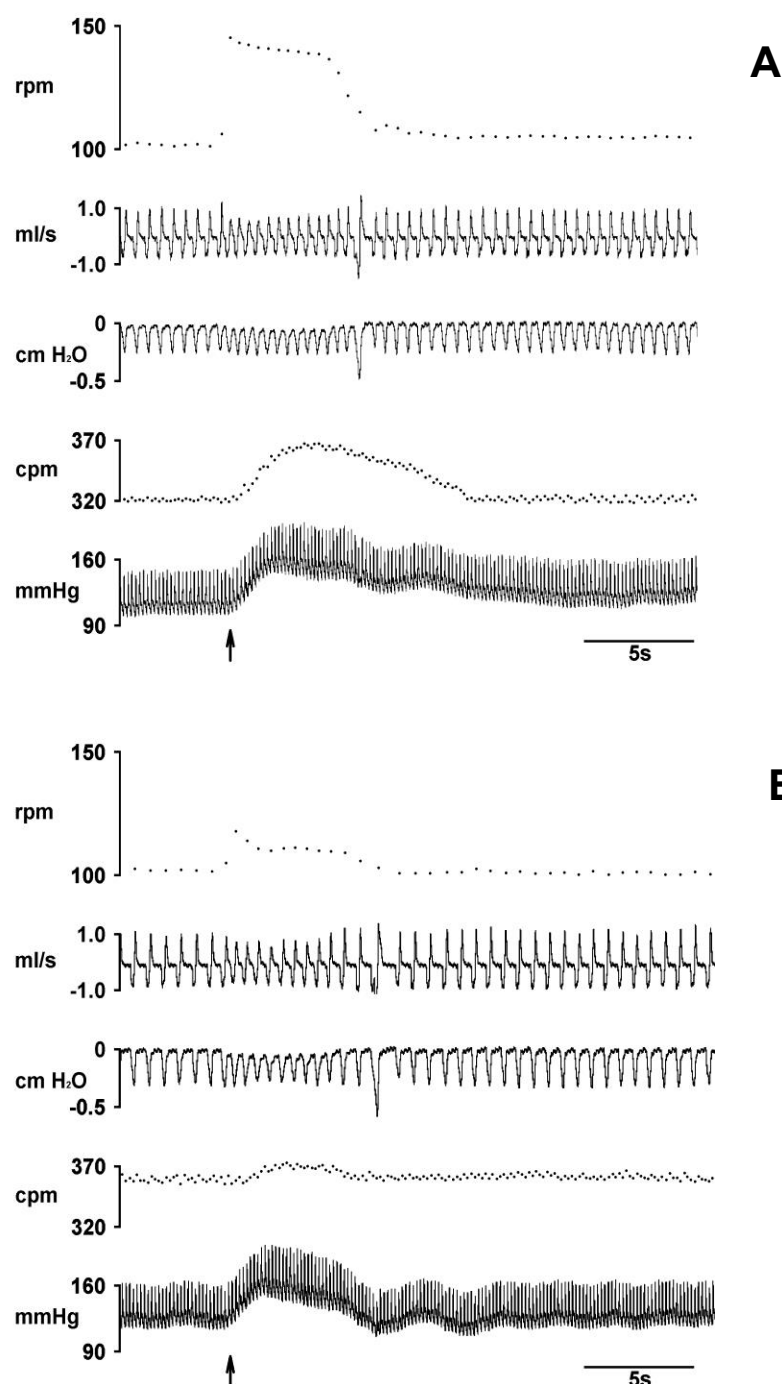
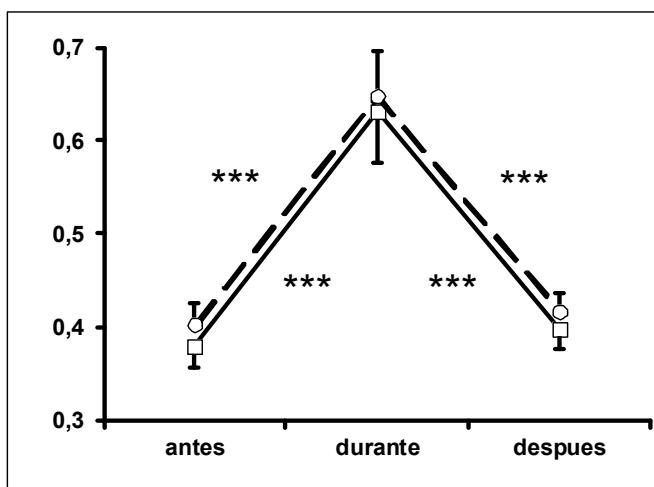
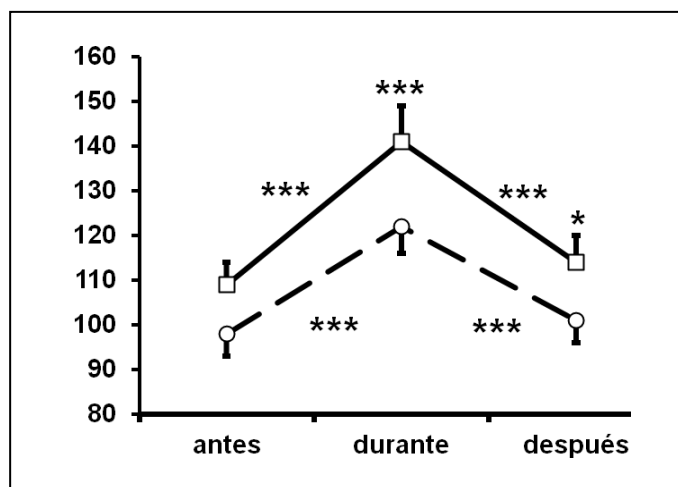


Figura 4.6.2. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación eléctrica de la SGPdI antes (A) y cuatro minutos después (B) de la microinyección de CNQX en el Área A5 (flecha vertical hacia arriba). La estimulación eléctrica tiene una duración de cinco segundos.

Se representan de arriba hacia abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea, flujo respiratorio, presión pleural, frecuencia cardíaca instantánea y presión arterial.

Frecuencia Respiratoria (rpm)

Presión Pleural (cmH₂O)



Tiempo Espiratorio (s)

Tiempo Inspiratorio (s)

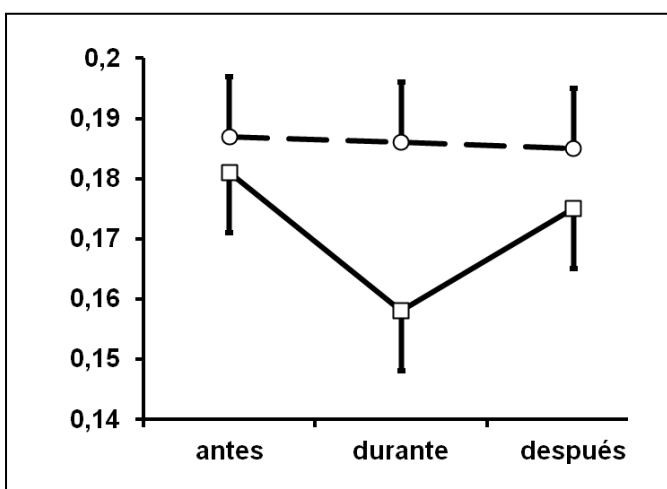
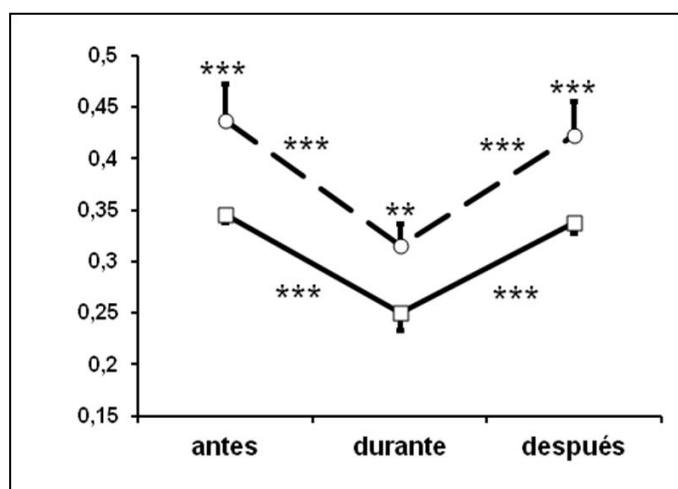


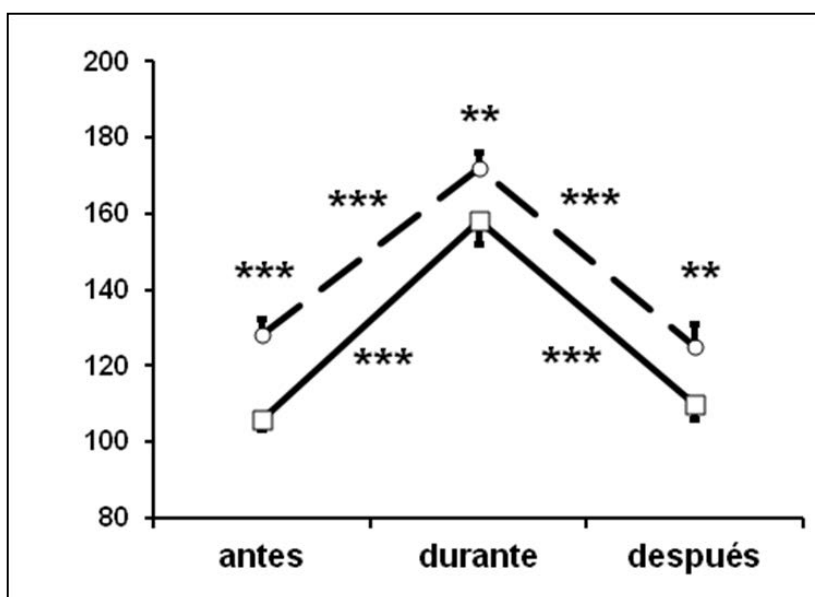
Figura 4.6.3. Cambios en los parámetros respiratorios promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdl.

Se representan, de arriba hacia abajo, frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de CNQX en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Presión Arterial (mmHg)



Frecuencia Cardíaca (cpm)

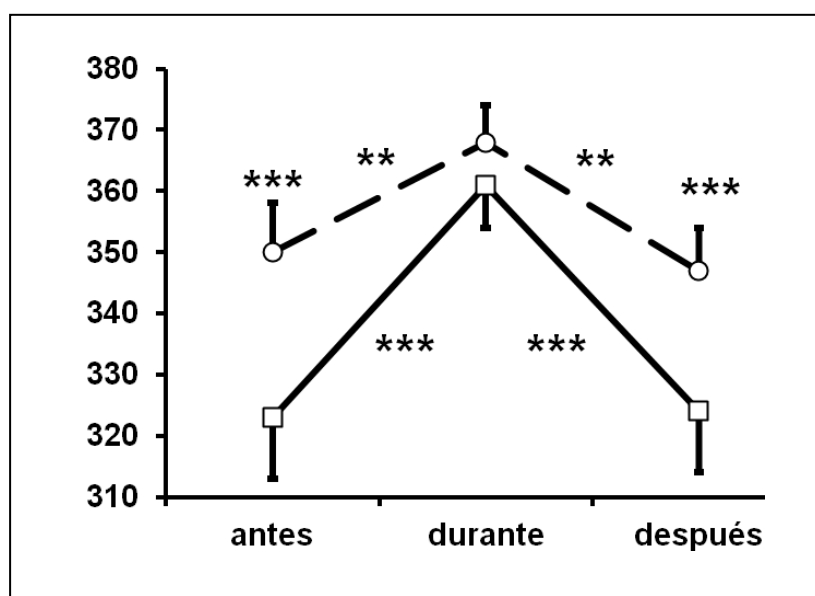
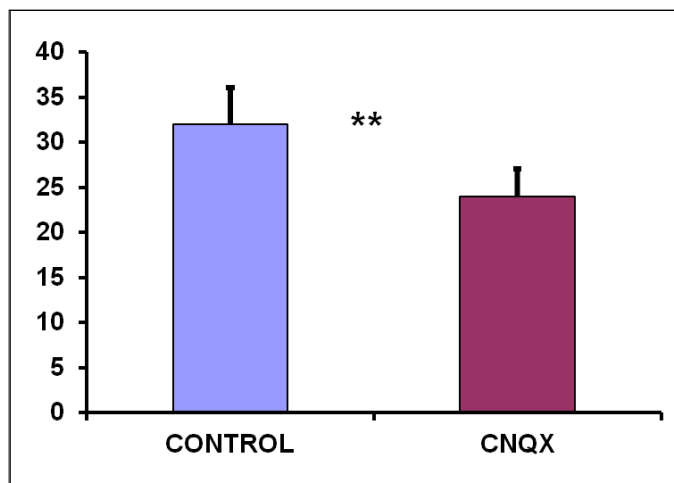
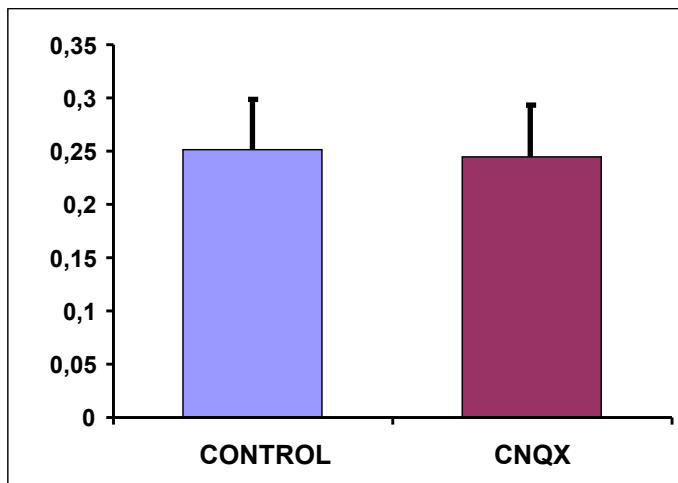


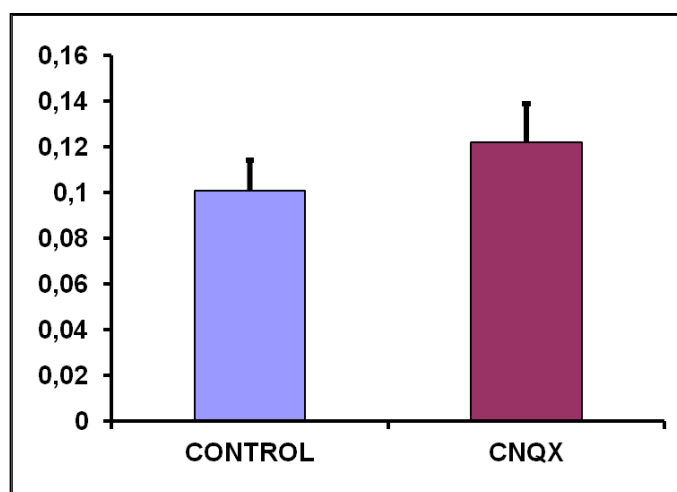
Figura 4.6.4. Cambios en la respuesta presora (arriba) y cardíaca (abajo) promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdl.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de CNQX en el Área A5. Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Frecuencia Respiratoria (rpm)

Presión Pleural (cmH₂O)

Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

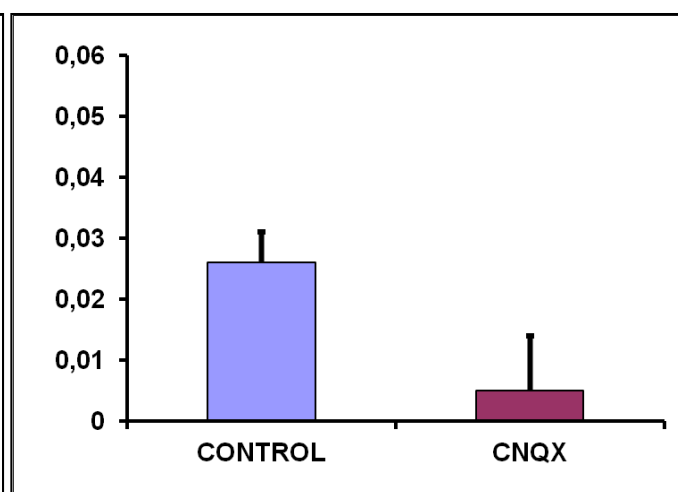


Figura 4.6.5. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de las variables respiratorias durante la estimulación eléctrica de la SGPdl.

Se representan de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, la frecuencia respiratoria, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

En azul se representa la estimulación control. En rojo se representa la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de CNQX en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

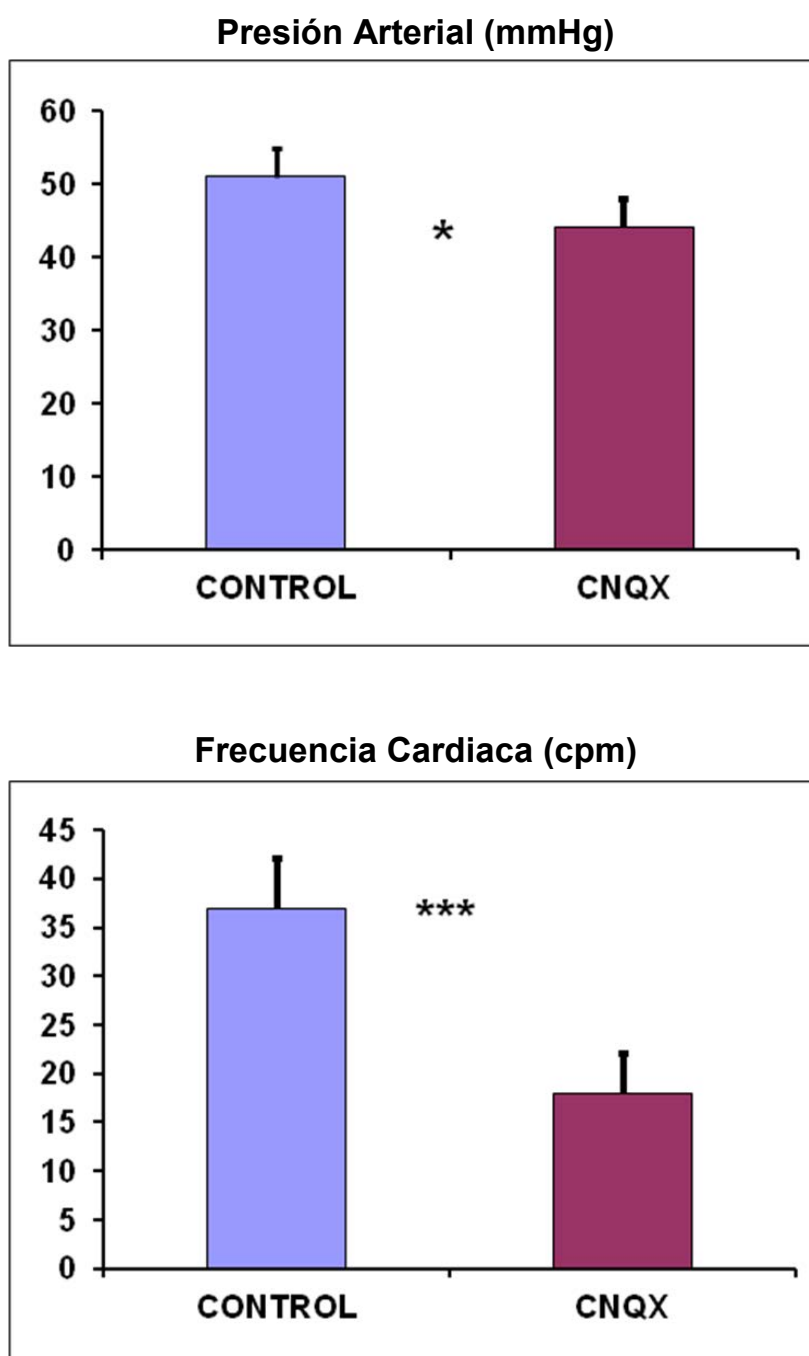


Figura 4.6.6. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de la presión arterial (arriba) y frecuencia cardíaca (abajo) durante la estimulación eléctrica de la SGPdl.

En azul se muestra la estimulación control y en rojo la estimulación de la SGPdl tras microinyección de CNQX en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media.

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Ti (s)	Ctrl	0.181 ± 0.01	0.158 ± 0.01	0.175 ± 0.01
	CNQX	0.187 ± 0.01	0.186 ± 0.01	0.185 ± 0.01
Te (s)	Ctrl	0.345 ± 0.01	0.250 ± 0.02 ***	0.338 ± 0.01
	CNQX	0.437 ± 0.04	0.315 ± 0.02 ***	0.423 ± 0.03
FR (rpm)	Ctrl	109 ± 5	141 ± 8 ***	114 ± 6
	CNQX	98 ± 5	122 ± 6 ***	101 ± 5
PP(cmH ₂ O)	Ctrl	0.380 ± 0.02	0.631 ± 0.05 ***	0.399 ± 0.02
	CNQX	0.403 ± 0.02	0.648 ± 0.05 ***	0.417 ± 0.02

Tabla 4.6.I. Respuesta respiratoria evocada por estimulación de la SGPdl antes, durante y después de la microinyección de CNQX en el Área A5. Se muestran los valores promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR) y presión pleural (PP).

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
PA (mmHg)	Ctrl	106 ± 3	158 ± 6 ***	110 ± 4
	CNQX	128 ± 4	172 ± 4 ***	125 ± 6
FC (cpm)	Ctrl	323 ± 10	361 ± 7 ***	324 ± 10
	CNQX	350 ± 8	368 ± 6 **	347 ± 7

Tabla 4.6.II. Respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPdl antes, durante y después de la microinyección de CNQX en el Área A5.

Se muestran los valores promediados de presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Todos los datos se muestran como media ± el error estándar de la media. Los valores de p son: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	Ti (s)	Te (s)	FR (rpm)	PP (cmH ₂ O)	PA (mmHg)	FC (cpm)
Control	0.026 ± 0.01	0.101 ± 0.01	32 ± 4	0.251 ± 0.05	51 ± 4	37 ± 5
CNQX	0.005 ± 0.01	0.122 ± 0.02	24 ± 3 **	0.245 ± 0.05	44 ± 4 *	18 ± 4 ***

Tabla 4.6.III. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación de la SGPdI antes y después de la microinyección de CNQX en el Área A5. Se muestran los cambios en valores absolutos promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

4.7. Caracterización de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de MCPG en el Área A5

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl antes y después de la microinyección de MCPG (10 mM) en el Área A5 (7 ratas).

La respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio, incremento de la presión pleural inspiratoria y aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca. Figuras 4.7.2A, 4.7.3, 4.7.4, 4.7.5, 4.7.6; Tablas 4.7.I, 4.7.II y 4.7.III.

La localización de las zonas de microinyección se observa en la figura 4.7.1.

La microinyección de MCPG en el Área A5 (50-100 nL, 0.5-1 nmol, n=7) produjo en todos los casos un incremento bifásico de presión arterial. En dos animales aumenta la frecuencia cardíaca acompañada de apnea. La frecuencia respiratoria disminuye en un animal tras la administración de MCPG.

Tras cuatro minutos de la microinyección de MCPG en el Área A5 no se producen cambios significativos en las variables cardiorrespiratorias de reposo.

Respuesta respiratoria

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl no se modifica tras la microinyección de MCPG en el Área A5

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl cuatro minutos después de la microinyección de MCPG en el Área A5 se caracterizó por un incremento de frecuencia respiratoria (de 87 ± 7 a 112 ± 6 rpm, $p < 0.01$) por disminución del tiempo espiratorio (de 0.468 ± 0.05 a 0.320 ± 0.03 s, $p < 0.001$) e incremento de presión pleural inspiratoria (de 0.319 ± 0.02 a 0.505 ± 0.02 cmH₂O, $p < 0.001$). No se produjeron cambios en el tiempo inspiratorio (de 0.239 ± 0.01 a 0.222 ± 0.01 s). Figuras 4.7.2B, 4.7.3; Tabla 4.7.I.

El incremento en valores absolutos de la frecuencia respiratoria es de 25 ± 5 rpm, este incremento se produjo por una disminución en valores absolutos del tiempo espiratorio de 0.183 ± 0.05 s. Los cambios en valores absolutos del tiempo inspiratorio son de 0.041 ± 0.01 s y de presión pleural inspiratoria son de 0.19 ± 0.03 cmH₂O. Figura 4.7.5; Tabla 4.7.III.

No hubo cambios significativos en los incrementos en valores absolutos de frecuencia respiratoria (de 25 ± 4 a 25 ± 5 rpm) de tiempo espiratorio (de 0.101 ± 0.02 a 0.183 ± 0.05) de tiempo inspiratorio (de 0.054 ± 0.01 a 0.041 ± 0.01) y de presión pleural inspiratoria (de 0.19 ± 0.01 a 0.19 ± 0.03). Figura 4.7.5; Tabla 4.7.III.

Respuesta cardiovascular

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de MCPG en el Área A5. Se producen cambios significativos tanto de presión arterial como de frecuencia cardíaca reduciéndose sus aumentos tras la microinyección de MCPG en el Área A5:

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl cuatro minutos después de la microinyección de MCPG en el Área A5 se caracterizó por un incremento de la presión arterial (de 116 ± 8 a 166 ± 11 mmHg, $p < 0.001$) y una completa abolición del aumento de la frecuencia cardíaca (de 340 ± 14 a 359 ± 17 cpm). Figuras 4.7.2B, 4.7.4; Tabla 4.7.II.

Los cambios en valores absolutos de la presión arterial y frecuencia cardíaca son de 50 ± 6 mmHg y 19 ± 4 cpm respectivamente. Figura 4.7.6; Tabla 4.7.III.

Se produjo un menor incremento significativo en valores absolutos de presión arterial (de 61 ± 6 a 50 ± 6 mmHg, $p < 0.05$) y una disminución significativa de la frecuencia cardíaca (de 41 ± 5 a 19 ± 4 cpm, $p < 0.001$). Figura 4.7.6; Tabla 4.7.III.

Otros resultados

En cinco animales, tras la microinyección bilateral de MCPG, se produce una depresión gradual de la frecuencia respiratoria, que finaliza con la muerte de los mismos (localización de la microinyección en el Área A5).

En otro animal se microinyectó fuera de la zona de estudio. La microinyección no produjo ningún cambio cardiorrespiratorio por sí misma ni tras la estimulación de la SGPdI (localización entre las zonas del núcleo sensorial principal del trigémino parte ventrolateral – tracto espinal del trigémino – nervio facial, Pr5VL - Sp5 - 7n).

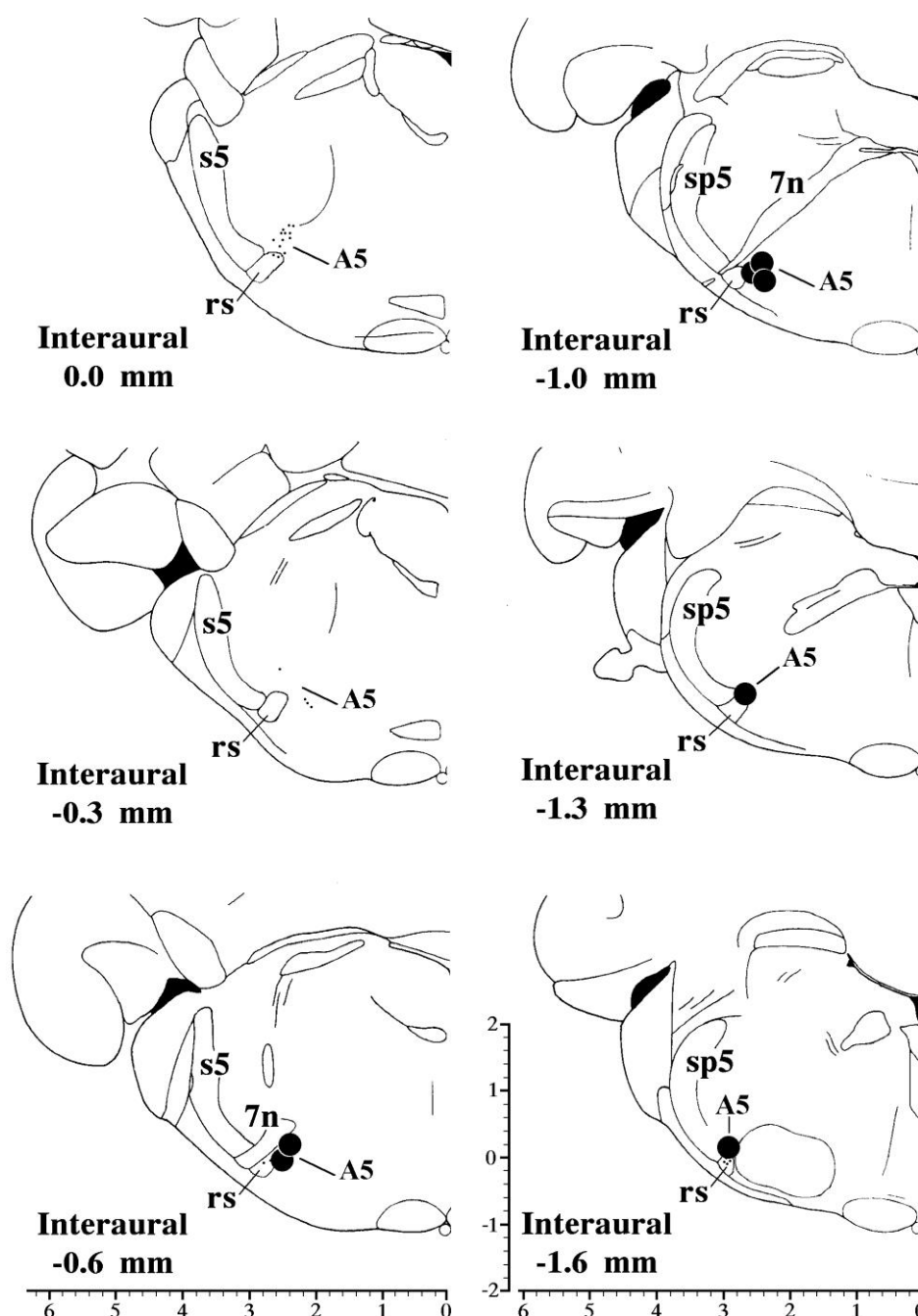


Figura 4.7.1. Esquematzación en secciones coronales del Área A5 desde la porción rostral (parte superior izquierda) a la porción caudal (parte inferior derecha), que muestra la localización de las zonas de microinyección de MCPG en el Área A5.

(A5) Área A5 catecolaminérgica; (7n) nervio facial o raíz de este nervio; (rs) tracto rubroespinal; (s5) raíz sensorial del nervio trigémino; (sp5) tracto trigéminoespinal.

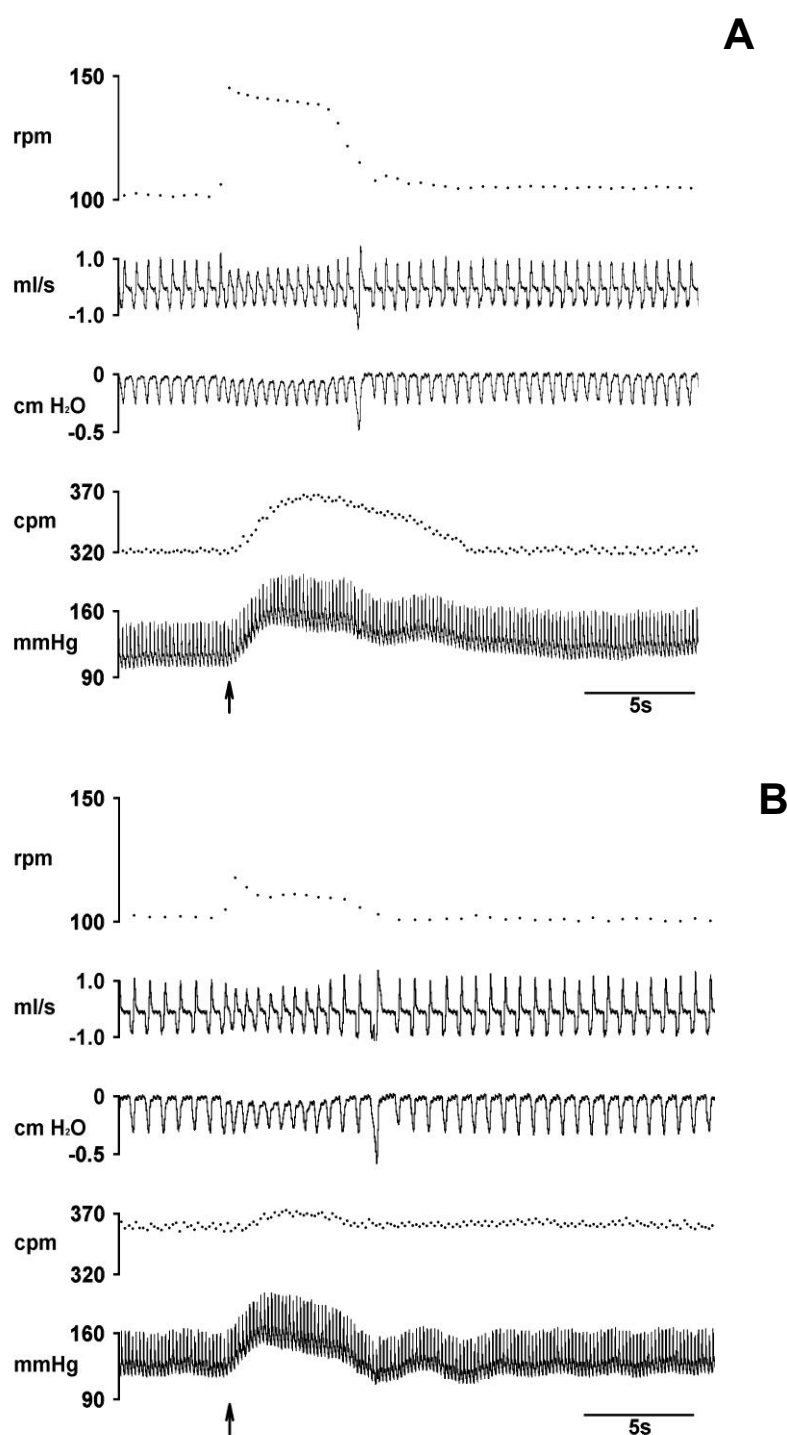
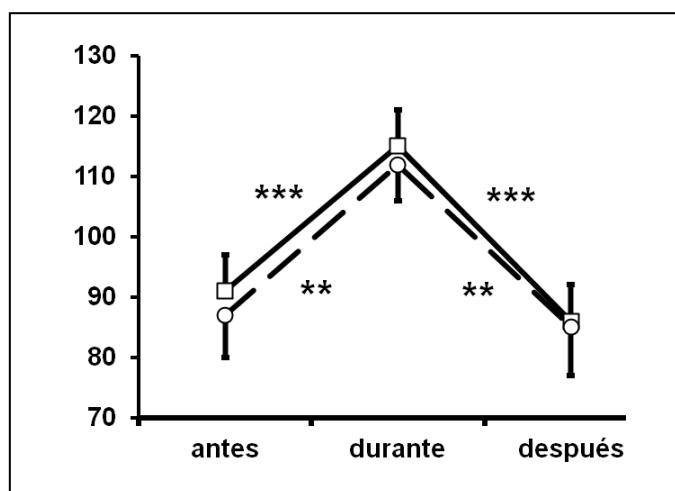


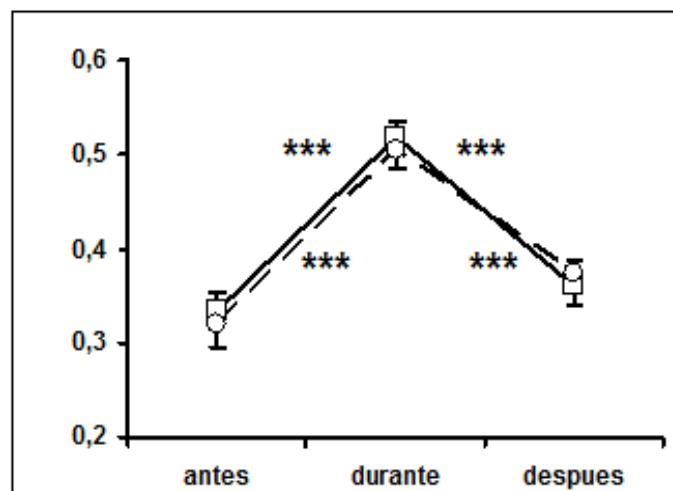
Figura 4.7.2. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación eléctrica de la SGPdI antes (a) y cuatro minutos después (b) de la microinyección de MCPG en el Área A5 (flecha vertical hacia arriba). La estimulación eléctrica tiene una duración de cinco segundos.

Se representan de arriba hacia abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea, flujo respiratorio, presión pleural, frecuencia cardíaca instantánea y presión arterial.

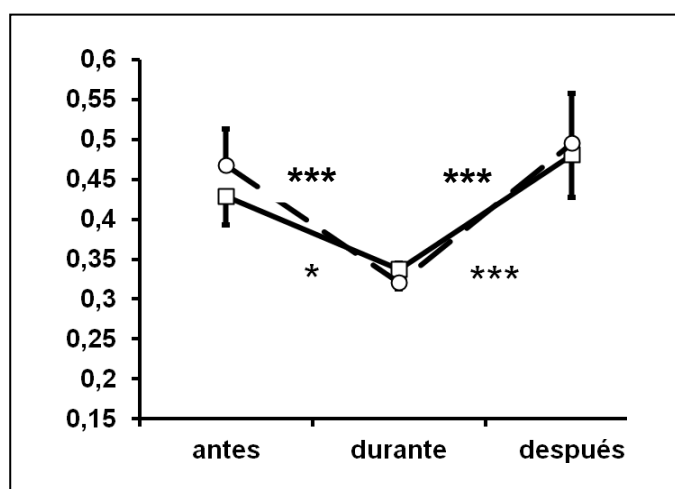
Frecuencia Respiratoria (rpm)



Presión Pleural (cmH₂O)



Tiempo Espiratorio (s)



Tiempo Inspiratorio (s)

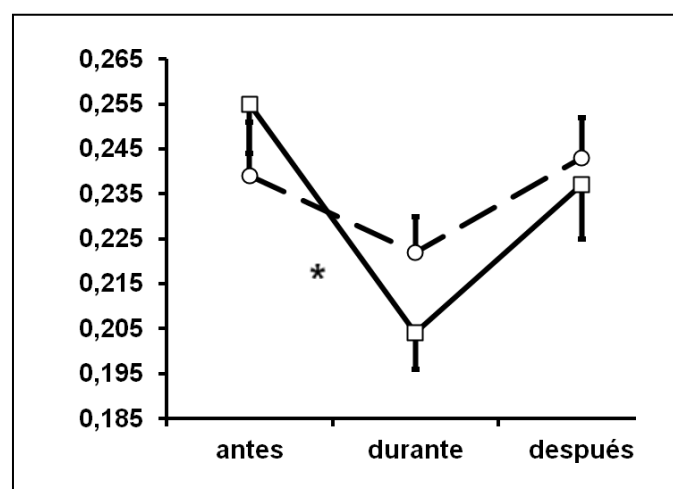


Figura 4.7.3. Cambios en los parámetros respiratorios promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdl. Se representan, de arriba hacia abajo, frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de MCPG en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

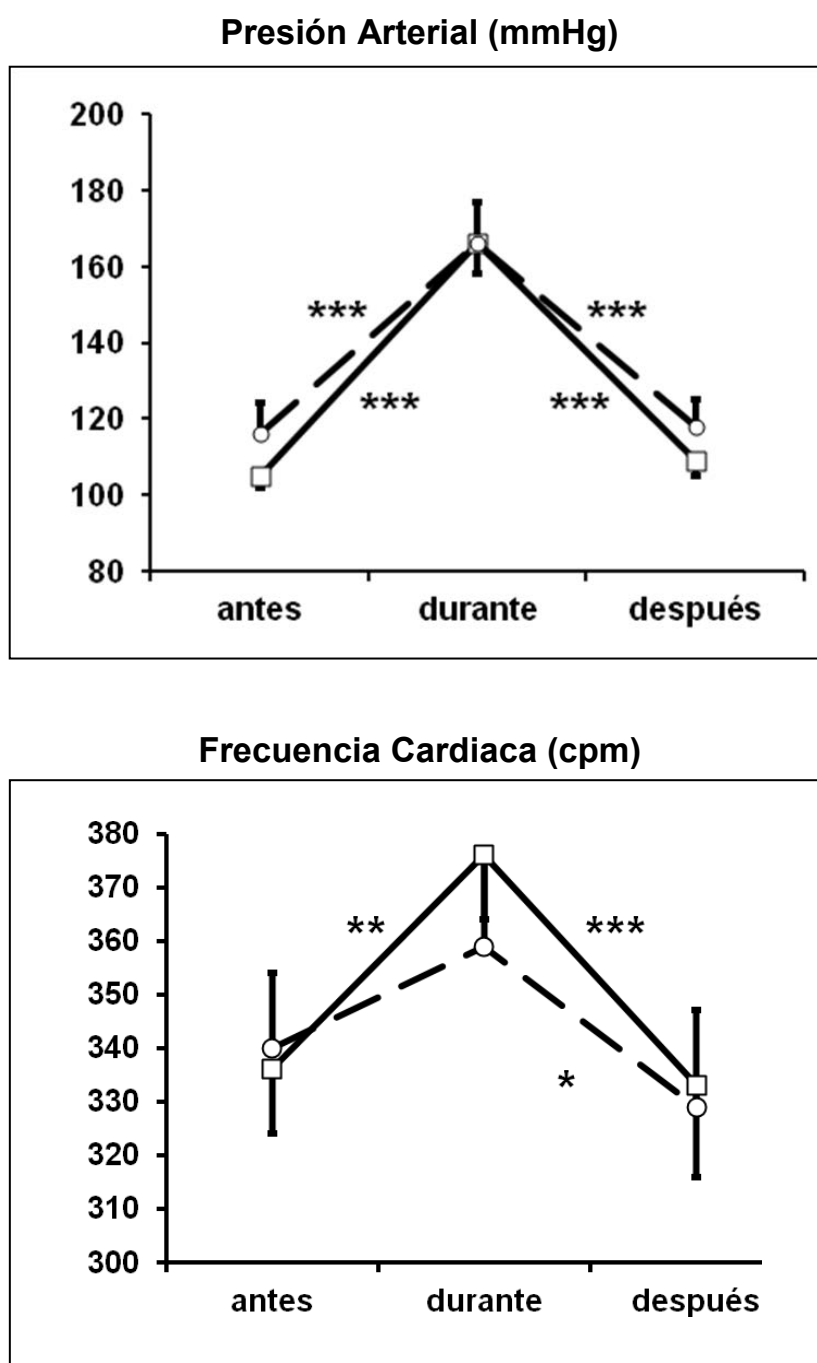


Figura 4.7.4. Cambios en la respuesta presora (arriba) y cardíaca (abajo) promediados (n=7) obtenidos 5 segundos antes, durante y 20 segundos después de la estimulación eléctrica de la SGPdl.

La línea continua representa la estimulación control. La línea discontinua representa la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de MCPG en el Área A5. Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

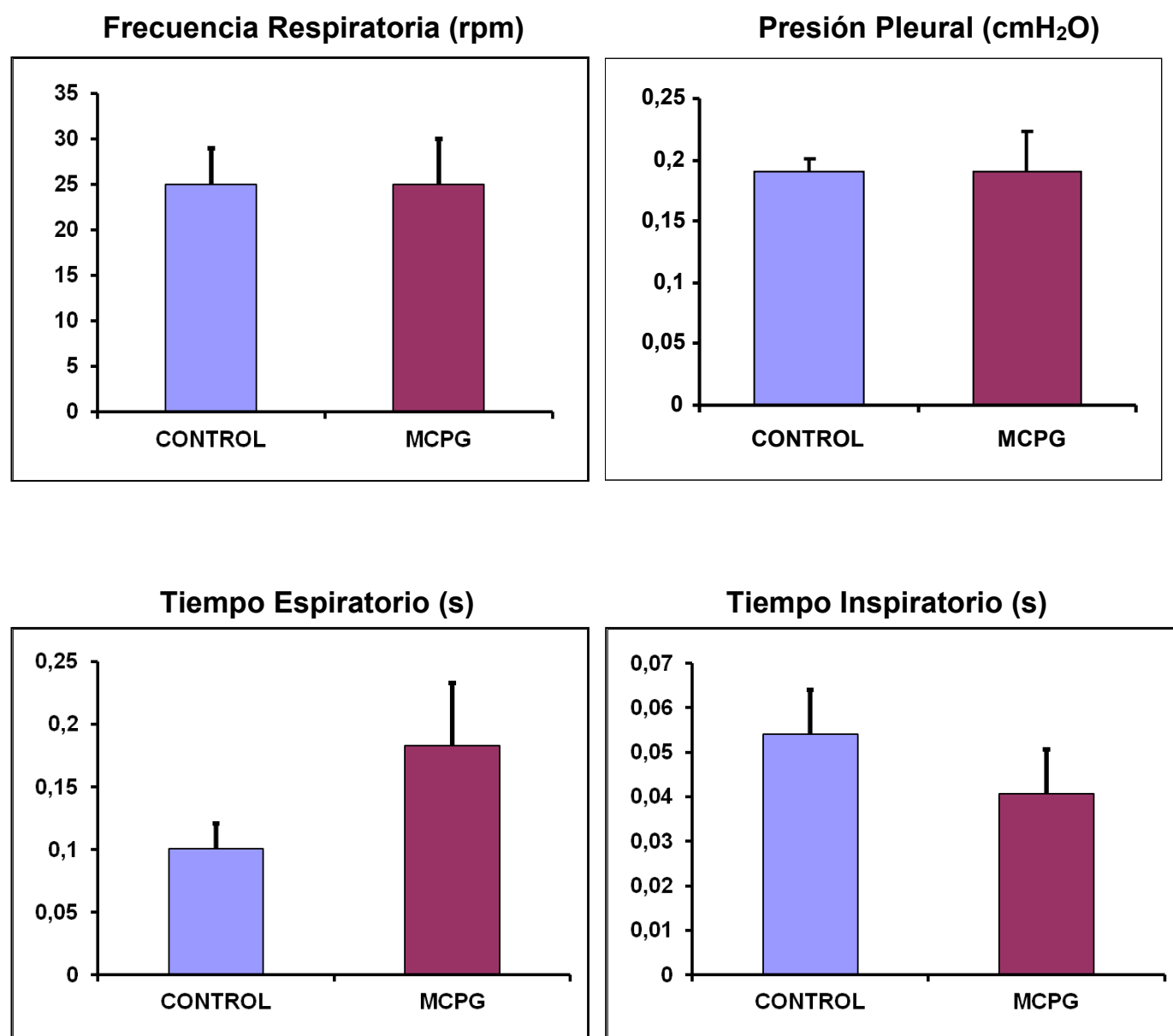


Figura 4.7.5. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de las variables respiratorias durante la estimulación eléctrica de la SGPdI. Se representan de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, la frecuencia respiratoria, presión pleural, tiempo espiratorio y tiempo inspiratorio.

En azul se representa la estimulación control. En rojo se representa la estimulación de la SGPdI tras la microinyección de MCPG en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

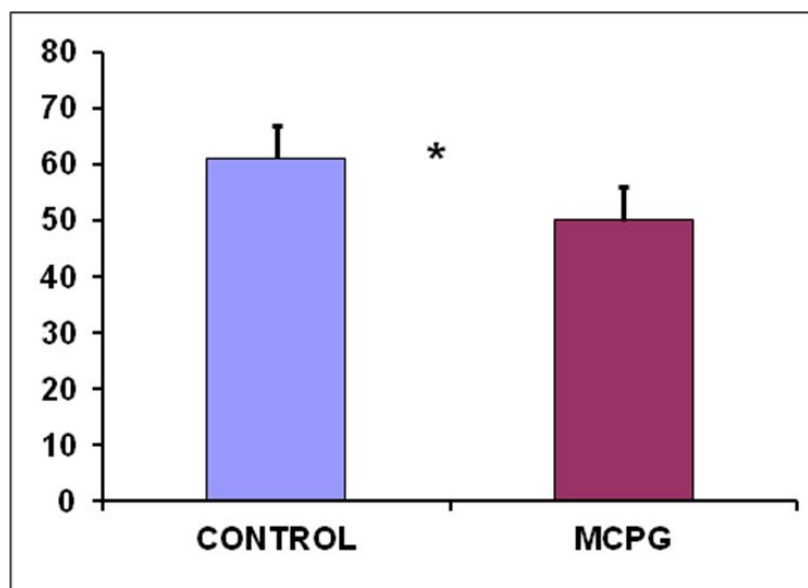
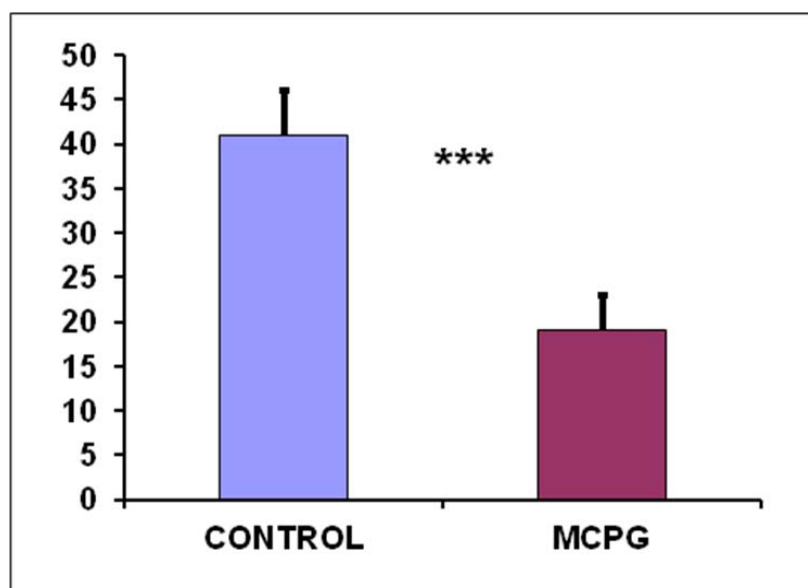
Presión Arterial (mmHg)**Frecuencia Cardiaca (cpm)**

Figura 4.7.6. Cambios en valores absolutos promediados (n=7) de la presión arterial (arriba) y frecuencia cardiaca (abajo) durante la estimulación eléctrica de la SGPdl.

En azul se muestra la estimulación control y en rojo la estimulación de la SGPdl tras microinyección de MCPG en el Área A5.

Los datos se muestran como media \pm el error estándar de la media.

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Ti (s)	Ctrl	0.255 ± 0.01	0.204 ± 0.01 *	0.237 ± 0.01
	MCPG	0.239 ± 0.01	0.222 ± 0.01	0.243 ± 0.01
Te (s)	Ctrl	0.428 ± 0.04	0.337 ± 0.03 *	0.481 ± 0.05
	MCPG	0.468 ± 0.05	0.320 ± 0.03 ***	0.495 ± 0.06
FR (rpm)	Ctrl	91 ± 6	115 ± 6 ***	86 ± 6
	MCPG	87 ± 7	112 ± 6 **	85 ± 8
PP(cmH ₂ O)	Ctrl	0.333 ± 0.02	0.519 ± 0.02 ***	0.361 ± 0.03
	MCPG	0.319 ± 0.02	0.505 ± 0.02 ***	0.374 ± 0.03

Tabla 4.7.I. Respuesta respiratoria evocada por estimulación de la SGPdI antes, durante y después de la microinyección de MCPG en el Área A5. Se muestran los valores promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR) y presión pleural (PP).

		ANTES	DURANTE	DESPUÉS
PA (mmHg)	Ctrl	105 ± 3	166 ± 8 ***	109 ± 4
	MCPG	116 ± 8	166 ± 11 ***	118 ± 7
FC (cpm)	Ctrl	336 ± 12	376 ± 12 **	333 ± 17
	MCPG	340 ± 14	359 ± 17	329 ± 18

Tabla 4.7.II. Respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPdl antes, durante y después de la microinyección de MCPG en el Área A5. Se muestran los valores promediados de presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Todos los datos se muestran como media ± el error estándar de la media. Los valores de p son: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	Ti (s)	Te (s)	FR (rpm)	PP (cmH ₂ O)	PA (mmHg)	FC (cpm)
Control	0.054 ± 0.01	0.101 ± 0.02	25 ± 4	0.190 ± 0.01	61 ± 6	41 ± 5
MCPG	0.041 ± 0.01	0.183 ± 0.05	25 ± 5	0.190 ± 0.03	50 ± 6 *	19 ± 4 ***

Tabla 4.7.III. Cambios cardiorrespiratorios durante la estimulación de la SGPdl antes y después de la microinyección de MCPG en el Área A5. Se muestran los cambios en valores absolutos promediados de tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Consideraciones generales

El Área A5 fue descrito por primera vez en rata, en 1964, por Dahlström y Fuxe y se ha definido como un conjunto de neuronas catecolaminérgicas (noradrenérgicas) que forman una estrecha columna de células localizada en la zona ventrolateral de la formación reticular parvicelular dentro de la parte caudal de la protuberancia (Byrum y cols. 1984).

Se la ha dividido en tres regiones atendiendo a su localización espacial: lateral, dorsal y caudal. Se puede decir que la subdivisión lateral es la que presenta un mayor número de neuronas, mientras que las otras dos subdivisiones están formadas por un número muy reducido de células.

La mayoría de las neuronas del Área A5 son catecolaminérgicas aunque, entre ellas, hay otras neuronas que no lo son (Jodkowsky y cols., 1994 y 1997; Goodchild y Pilowsky, 2001). Las neuronas catecolaminérgicas presentan los mecanismos enzimáticos necesarios que caracterizan a las neuronas noradrenérgicas (Goodchild y Pilowsky, 2001), es decir, incluyen:

- Tirosina Hidroxilasa (TH)
- L-aminoácido aromático Descarboxilasa (aaDC)
- Dopamina Beta Hidroxilasa (D β OH).

Las neuronas del Área A5 poseen actividad propia in vitro. La gran mayoría de las neuronas del Área A5 presentan una frecuencia de

descarga espontánea baja (entre 2 y 4 descargas por segundo). La actividad espontánea de la mayoría de las células del Área A5 parece deberse a propiedades intrínsecas más que a aferencias sinápticas. Otra característica es que la actividad espontánea cesa o disminuye ante aumentos de presión arterial. Se sabe también que presentan una velocidad de conducción característica de neuronas con poca o ninguna mielinización (1-3 m/s), es decir, son fibras C.

El Área A5 se ha asociado históricamente con el control central cardiorrespiratorio (Dawid-Milner y cols., 2002; Pilowsky y Goodchild, 2002; Dampney y Horiuchi, 2003; Dampney y cols., 2003; Dawid Milner y cols., 2003; Guyenet, 2006; Taxini y cols. 2011; Kanbar y cols., 2011; Abbott y cols., 2012; López-González y cols., 2013), aunque en las últimas décadas ha sido implicado en otra serie de funciones viscerales como la nocicepción (Clark y Proudfit, 1993; Heinricher y cols., 2009; Marques-Lopes y cols., 2010). Además, en el hombre, sus alteraciones parecen estar involucradas en algunas de las manifestaciones cardiorrespiratorias que se observan en algunas patologías como el Síndrome de Rett y el mal de Ondine que actualmente se engloban dentro de los factores etiológicos responsables del Síndrome de Muerte Súbita Infantil (Obonai y cols., 1998; Cann-Moisán y cols., 1999; Ozawa y cols., 1999, 2003; Julu y cols., 2001; Sasaki y cols., 2003; Horne y cols., 2004; Ribas-Salgueiro y cols., 2004; Gaultier y cols., 2004; Weese-Mayer y cols., 2004) o en la atrofia multisistémica (Benarroch, 2008).

Observando las aferencias y eferencias, podríamos considerar al Área A5 como un centro privilegiado en la integración de la información autonómica desde el tronco del encéfalo caudal al encéfalo anterior. Sabemos que la protuberancia es el blanco de proyecciones descendentes desde el encéfalo anterior, hipotálamo, mesencéfalo y cerebelo, y también indirectamente de aferencias reflejas que ascienden

desde el parénquima pulmonar y vías respiratorias (Allen y cols., 1991; Paton y cols., 1991). El Área A5 también tiene conexiones anatómicas precisas y apropiadas con distintos núcleos bulbares y espinales para producir cambios en la actividad respiratoria y cardiovascular (Blessing y cols., 1981; Westlund y cols., 1984; Byrum y cols., 1984; Loewy y cols., 1979, 1986; Byrum y Guyenet, 1987; Strack y cols., 1989; Kwiat y Basbaum, 1990; Huangfu, Koshiya y Guyenet 1991; Clark y Proudfit, 1993; Bajic y Proudfit, 1999).

Existen evidencias de que el Área A5 proyecta ampliamente a áreas del encéfalo anterior involucradas en la regulación cardiovascular y en la reacción de defensa (Byrum y Guyenet, 1987). Los efectos cardiovasculares evocados por activación del Área A5 son producidos, en parte, por el control del reflejo barorreceptor a nivel del núcleo del tracto solitario (NTS). El mecanismo es similar al producido durante la reacción de defensa evocada por estimulación del área de defensa hipotalámica (Felder y Mifflin, 1994). Parece existir una modulación inhibitoria del reflejo barorreceptor por la activación de receptores NMDA y no NMDA del bulbo rostroventrolateral (Moriguchi y cols., 1995).

Se interpreta que una inhibición del reflejo barorreceptor podría ser uno de los mecanismos por el cual la respuesta presora evocada centralmente podría mantenerse bajo una gran variedad de situaciones de estrés medioambiental, incluyendo la reacción de defensa. La activación del núcleo paraventricular hipotalámico (Coote y cols., 1979; Hwang y col., 1998), del núcleo Dorsomedial Hipotalámico o la región Perifornical Hipotalámica (Allen y Cechetto, 1992, 1993; Stotz-Potter y cols., 1996; DiMicco y cols., 2002; Sévoz-Couche y cols., 2003; Cao y cols., 2004; Horiuchi y cols., 2004; McDowall y cols., 2006) o de la sustancia gris periacueductal (Nosaka y cols., 1993; Huang y cols., 2000; Bitencourt y cols., 2004; Subramanian y cols., 2008; Ligaya y cols., 2010) parece

promover la respuesta presora y la inhibición de la respuesta barorreceptora. Las distintas regiones del encéfalo anterior cuya estimulación evoca una respuesta de defensa y las redes nociceptivas centrales presentan densas conexiones hacia el Área A5 (Byrum y Guyenet, 1987). Así, esta modulación descendente, supuestamente inhibidora del reflejo barorreceptor por la activación del Área A5 proporciona el circuito necesario mediante el cual estos núcleos del encéfalo anterior inducirían la respuesta presora. Es más, esto lo pudimos demostrar, desde nuestro grupo de trabajo, con la publicación de López-González y cols en 2013. Donde se producía un bloqueo de esta componente cardiovascular evocada por la estimulación desde el Área de Defensa Hipotalámica tras la inhibición del Área A5 con muscimol.

Basándonos en todos estos datos, este trabajo de tesis doctoral nos ha permitido destacar el papel del Área A5 en la modulación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI.

La estimulación eléctrica de la SGPdI produce aumento de frecuencia respiratoria asociado a un incremento de presión arterial y taquicardia. Esta respuesta parece ser debida a la activación del reflejo quimiorreceptor (Silva-Carvalho y cols., 1993; 1995) y a la inhibición del reflejo barorreceptor. Estas dos modulaciones tienen lugar a nivel del NTS (Jordan y cols., 1988; Mifflin y cols., 1988 a, b). Nuestro estudio pretende desvelar si la posible inhibición del reflejo barorreceptor evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI utiliza como centro intermediario al Área A5, que sería el responsable final de la modulación inhibidora sobre la actividad barorreceptora y la modulación excitadora sobre la actividad quimiorreceptora.

En una primera fase de este estudio, por medio de la microinyección de Muscimol, hemos demostrado la existencia de una estrecha relación funcional entre el SGPdl y el Área A5. En una segunda fase, demostramos la participación del glutamato como uno de los neurotransmisores excitadores necesarios para la modulación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. El estudio finaliza con un grupo de experimentos que nos proporcionan evidencias que demuestran que los receptores de glutamato ionotrópicos (NMDA y no NMDA) y metabotrópicos están involucrados de una u otra forma, en función de su localización dentro del Área A5, en la mediación de esta respuesta.

Muchos autores, entre ellos nuestro grupo, hemos sugerido que las neuronas de esta zona tienen un papel simpatoexcitador (Guyenet y Byrum, 1985; Huangfu y cols., 1991; Guyenet y cols., 1993; Dawid Milner y cols., 2001 y 2003; López-González y cols., 2013). De acuerdo con estos autores, nuestros datos corroboran estos resultados, mostrando las primeras evidencias de interacción entre las neuronas de la SGPdl y del Área A5 poniendo de manifiesto la estrecha relación funcional entre ambas zonas y ver qué papel tiene el Área A5 en la respuesta cardiorrespiratoria evocada desde el SGPdl y el posible papel del glutamato como neurotransmisor implicado en ella.

5.2. Metodología utilizada

Todos los experimentos se han llevado a cabo en rata entera anestesiada y con respiración espontánea. La rata es el animal que con más frecuencia está siendo usado en estos últimos años para el estudio de las estructuras nerviosas implicadas en el control cardiorrespiratorio, y este es uno de los principales motivos de su elección como animal de experimentación. Ha sido posible encontrar algunas referencias bibliográficas con explicaciones acerca de aspectos morfológicos, fisiológicos, etc., de estas estructuras, y concretamente de la SGPdl y del Área A5.

Un aspecto básico de este tipo de experimentos es que se puedan reproducir lo más fielmente posible las condiciones fisiológicas, de aquí la conveniencia del empleo del animal entero. Por esta misma razón se procuró también que la administración de anestesia no causara una alteración de las variables cardiorrespiratorias que pudiera influir en el resultado del experimento. Por lo que respecta a la preparación quirúrgica previa, su propósito es que, en el transcurso del experimento, puedan efectuarse la observación y análisis de las modificaciones (producidas por la estimulación eléctrica y por las microinyecciones de fármacos) de los diversos parámetros respiratorios y cardiovasculares (frecuencia respiratoria instantánea, presión pleural, presión arterial y frecuencia cardíaca instantánea). El análisis de los cambios obtenidos en las diferentes variables proporciona una información muy completa de los efectos de la estimulación y microinyección en el animal. El trabajo con animal entero posibilita evaluar estos efectos de manera global analizando la relación entre ellos.

En estos experimentos ha sido utilizada la microestimulación eléctrica para evocar la respuesta cardiorrespiratoria de la SGPdl. Los

parámetros de la estimulación (1 ms, 100 Hz, 10-30 μ A durante 5 s) se han elegido con el fin de obtener una respuesta lo más fisiológica posible. Se han aplicado los parámetros de estimulación más utilizados en la bibliografía clásica (Hilton, 1982; Hilton y Redfern, 1986). Con respecto a la intensidad de estimulación, ha sido disminuida con respecto a los valores más usados en la bibliografía especializada para que la esfera de difusión de corriente sea la mínima posible, de forma que la respuesta se limite a la región de estudio. En todos los casos la intensidad ha sido suficiente para obtener la respuesta característica de la SGPdI.

Para la microinyección de fármacos se ha utilizado un sistema de bomba microinyectora micro4TM de (WPI). Se empleó para realizar las microinyecciones, en las cuales se utilizaron micropipetas de vidrio selladas con tubo de silicona con conexión a micropipeta Hamilton 7000.5 N para una inyección máxima de 500 nl.

Se tuvo cuidado al elegir las concentraciones y volúmenes adecuados para que su efecto no se difunda a las zonas más próximas. La dosis empleada de cada fármaco en nuestro trabajo ha sido elegida teniendo en cuenta diversas fuentes bibliográficas. Se ha utilizado siempre una dosis suficiente para producir los efectos deseados pero sin alcanzar las regiones vecinas que puedan producir otras respuestas miméticas o antagónicas (Lipski y col., 1988). Esta técnica para la microinyección de cantidades entre 10-100 nmol, ha sido recomendada por Goodchild y col., 1982, como una técnica de activación o inhibición de regiones localizadas en el sistema nervioso central, ya que su efecto está limitado a una región altamente localizada.

El fármaco microinyectado se diluye en PBS (phosphate buffer saline) con azul de Evans al 1% para el marcaje de las zonas de microinyección. Al diluir el fármaco en la mezcla de azul de Evans y PBS

no es necesario retirar éste durante el experimento y evita errores en la localización histológica.

La localización de la SGPdl se realizó situando el electrodo según las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (coordenada anteroposterior desde bregma a -4.0 mm, 0.6 mm lateral a la línea media y de 4.5 - 5.0 mm de profundidad con respecto a la superficie cerebral, Paxinos y Watson, 1997). Debemos tener en cuenta que la torre del equipo de estereotaxia donde está fijado el microelectrodo de estimulación, penetra en el cerebro del animal con una inclinación de 30° para evitar problemas de espacio con la segunda torre del equipo de estereotaxia, que se utiliza para la microinyección de fármacos en el área A5. Se empezó a estimular eléctricamente (10 - 30 μ A, 100 Hz, pulsos de 1 ms durante 5 s) a una profundidad de 3 mm a partir de la superficie de la calota, y se fue bajando el microelectrodo 100 μ m cada vez hasta que la estimulación eléctrica produjo la respuesta cardiorrespiratoria típica de la SGPdl (incremento de frecuencia respiratoria junto con incremento de presión arterial y frecuencia cardíaca).

Al final de cada experimento se verificó la localización de la lesión de la estimulación eléctrica y de la microinyección en los cortes histológicos. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos animales en los que la respuesta cardiorrespiratoria se correspondía con una buena localización de la SGPdl y del Área A5.

5.3. Estimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral (SGPdl)

La SGP de rata ha sido explorada usando estimulación eléctrica y química con el propósito de localizar las regiones con cuerpos o fibras neuronales capaces de iniciar o integrar los componentes viscerales y de conducta característicos de la reacción de defensa (Hilton y Redfern, 1986). Éstos son, como se ha mencionado ya, incremento de presión arterial y frecuencia cardíaca, incremento de la frecuencia respiratoria y otras respuestas como dilatación pupilar, la retracción de la membrana nictitante, piloerección y liberación de catecolaminas desde la glándula suprarrenal (Jordan, 1990). Nuestras observaciones coinciden con las respuestas citadas. En la literatura se puede comprobar que las columnas correspondientes a la SGPI y la SGPdl son las que inician la respuesta de defensa. Esta respuesta está asociada con taquicardia, hipertensión y redistribución del flujo sanguíneo. Esta respuesta simpatoexcitadora está mediada por el bulbo rostroventrolateral, el cual activa neuronas preganglionares simpáticas que controlan a los efectores cardiovasculares (Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001; Hayward, 2007; de Menezes, 2009).

Hemos observado también que la estimulación eléctrica fuera de estas áreas no produce una respuesta completa de defensa y, por tanto, no se han utilizado estos experimentos en nuestros resultados.

5.3.1. Efectos respiratorios y cardiovasculares

Apoyando los estudios previos con estimulación de la SGPdl, nuestros resultados confirman que la respuesta evocada por estimulación eléctrica se caracteriza por aumento de frecuencia respiratoria. Este incremento se produce fundamentalmente por disminución del tiempo

espiratorio, sin cambios significativos en el tiempo inspiratorio en la mayoría de los experimentos. Sin embargo, se observa un aumento del flujo inspiratorio por aumento de actividad frénica. La disminución del tiempo espiratorio se acompaña de un aumento de flujo espiratorio. Esta respuesta respiratoria se acompaña siempre de una respuesta cardiovascular concomitante. La respuesta cardiovascular se caracteriza por un incremento de presión arterial y frecuencia cardíaca.

Se ha interpretado que una de las funciones más importantes de la SGPDl es similar a la de otras zonas implicadas en la respuesta de defensa, por tanto, preparar al animal ante situaciones amenazantes o de estrés medioambiental, por ello es necesario redistribuir el flujo sanguíneo. Se mantiene la perfusión del músculo cardíaco y del SNC. Se incrementa la perfusión de aquellas zonas vasculares que requieren oxígeno adicional durante la respuesta de defensa y se disminuye en las zonas menos vitales, como el sistema renal o el gastroentérico. El incremento de la frecuencia cardíaca y presión arterial permite enviar un gran volumen sanguíneo al músculo esquelético que aumenta su actividad para la lucha o la huida. La respuesta se acompaña de un aumento de la ventilación que asegura una adecuada oxigenación de la sangre arterial y facilita la eliminación del CO₂ producido en la respuesta metabólica (Loewy, 1990).

La estimulación de la SGPDl activa por una vía indirecta neuronas del bulbo rostral ventrolateral (RVLM) que, a su vez, activan neuronas preganglionares simpáticas presentes en la columna intermediolateral de la médula espinal. Estas proyecciones son finalmente responsables de parte del incremento brusco de la presión arterial (Loewy, 1990; Loewy, 1991; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001; Hayward, 2007; de Menezes, 2009). Se sabe también que el aumento de presión arterial se produce por activación indirecta del RVLM por otras vías menos

estudiadas. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el papel del Área A5 en esta respuesta presora.

Como hemos dicho anteriormente, la SGPdl no tiene conexiones directas con el RVLM, responsable de la respuesta presora. Pero también es cierto que posee conexiones muy densas, de entrada y salida, a la zona hipotalámica responsable de la activación del RVLM durante la respuesta de defensa, y se sabe que la actividad cardiorrespiratoria de las neuronas de la SGPdl depende de la actividad de esas neuronas hipotalámicas (de Menezes y cols., 2009; Horiuchi y cols., 2009). Además, la SGPdl tiene conexión directa con el complejo Parabraquial lateral (Bester y cols, 1997). Así mismo, nuestro grupo de investigación ya demostró las conexiones funcionales existentes desde esta zona hipotalámica y la modulación de la respuesta de defensa por parte del Complejo Parabraquial (Díaz-Casares y cols., 2009) y del Área A5 (López-González y cols., 2013).

Está descrito también que la estimulación eléctrica de la SGPdl produce inhibición o una modulación o cambio en la sensibilidad del umbral de activación del reflejo barorreceptor y de la actividad del nervio simpático renal. El reflejo no quedaría propiamente inhibido sino que operaría en un rango de sensibilidad mucho más alto (Horiuchi y cols., 2006; McDowall y cols., 2006; Miki y Yoshimoto, 2010). Este resultado es el reflejo de la activación directa de las vías utilizadas por los somas de las neuronas hipotalámicas responsables de la reacción de defensa, incluidas las del DMH y de la facilitación del reflejo quimiorreceptor a nivel del NTS. Esta respuesta contribuiría de forma indirecta al aumento de presión arterial y por otra parte, es responsable de la taquicardia asociada (Silva-Carvalho y col., 1995). Ambas circunstancias, el aumento de la actividad del reflejo quimiorreceptor por medio de la excitación o facilitación de neuronas quimiorreceptoras del NTS (Silva-Carvalho y col.,

1995) y, de forma paralela, la inhibición o cambio en la sensibilidad del reflejo barorreceptor (Coote y col., 1979; Mifflin y col., 1988 b; Spyer, 1990) mediante la disfacilitación o la inhibición de neuronas barorreceptoras a nivel del NTS (Mifflin y col., 1988b; Jordan y col., 1988) son vitales para el correcto desarrollo de la respuesta de defensa propiamente dicha.

Esto implica que la estimulación de la SGPdl podría, en condiciones apropiadas, facilitar o inhibir el reflejo barorreceptor a través del NTS. Estas observaciones tienen una considerable importancia en la interpretación del papel de la SGPdl en la regulación de la respuesta cardiorrespiratoria a través del NTS.

Hasta hace muy poco se desconocía si la respuesta evocada a la estimulación eléctrica de la SGPdl era debida a la activación de somas específicos o a la activación de fibras de paso que tienen su origen fuera del mesencéfalo. Actualmente se sabe que la estimulación química de neuronas de los centros nerviosos responsables de la respuesta de defensa a nivel del hipotálamo y mesencéfalo provoca las mismas respuestas cardiorrespiratorias provocadas por estimulación eléctrica (Soltis y DiMicco, 1991; Segura y col., 1992; Peano y cols., 1992; DiMicco y cols., 1996; Fontes y cols., 2001; DiMicco y cols., 2002; Sevouz-Couche y cols., 2003; Horiuchi y cols., 2004; Cao y cols., 2004; Comet y cols., 2005; McDowall y cols., 2006; Bernard JF y cols., 2008; Netzer F y cols., 2009).

En la actualidad hay autores que han demostrado que la activación de la SGPdl activa receptores serotoninérgicos del tipo 5HT₃ además de los GABA_a y NK1 en el NTS sirviendo así como una posible fuente de inhibición de las neuronas barosensibles del NTS (Sevouz-Couche y cols., 2003; Bernard JF y cols., 2008; Netzer F y cols., 2009).

Se han descrito las proyecciones desde la SGP hacia los núcleos del rafe, concretamente al Grupo B3 (que comprende el rafe magno y el núcleo paragigantocelular lateral reticular) (Cameron y cols., 1995). Esta zona, se activa durante la reacción de defensa evocada por la estimulación eléctrica de la SGPdl (Bernard JF y cols., 2008).

Por lo que los resultados parecen demostrar que la respuesta cardiovascular presora y taquicardizante evocada desde la SGPdl, presentaría dos rutas descendentes, una responsable del aumento de presión arterial, vía activación del RVLM y otra responsable del aumento de frecuencia cardíaca, vía núcleos del rafe y su actuación sobre el NTS.

El concepto más actual indica que las distintas regiones que conforman la SGP tienen funciones sutilmente diferentes en la organización de la reacción de defensa. La estimulación combinada de cuerpos celulares de distintos subnúcleos colabora para una perfecta integración de la respuesta de hipertensión, taquicardia, taquipnea y cambios autonómicos clásicamente descritos para la reacción de defensa.

Este trabajo intenta dar nueva luz a las vías y los núcleos implicados en esta respuesta.

5.4. Efecto de la microinyección de Muscimol en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl

El propósito de este grupo de experimentos era demostrar la existencia de conexiones funcionales entre la SGPdl y el Área A5.

Con este primer grupo de experimentos demostramos la existencia de conexiones funcionales entre la SGPdl y el Área A5, que es capaz de modular la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl

Se escogió el Muscimol por ser un potente agonista de receptores GABA_A, a los que se une de forma reversible provocando un estado de hiperpolarización neuronal. Se ha descrito que casi todas las neuronas del SNC son susceptibles de hiperpolarización con agonistas GABA_A (Kiely y Gordon, 1994). Por este motivo se prefirió Muscimol a otras sustancias que actúan de forma similar. El Muscimol actúa únicamente sobre los somas de las neuronas del Área A5 sin afectar a los axones que atraviesan esa zona. De este modo, las modificaciones que se observan en la estimulación de la SGPdl después de la microinyección de Muscimol en el Área A5 se deben sólo a la inhibición de la actividad de las células localizadas en esta región.

El propósito de este grupo de experimentos era conocer el papel de los somas neuronales del Área A5 en la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Se realizaron microinyecciones de Muscimol (50-100 nl, 0.2-0.4 nmol), agonista GABAérgico, en el Área A5.

Después de la microinyección de Muscimol en el Área A5 se observó en reposo una disminución no significativa de la frecuencia respiratoria debido a un aumento del tiempo espiratorio

Los datos obtenidos demostraron que la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI se modifica tras la microinyección de Muscimol en el Área A5. El incremento de frecuencia respiratoria se ve reducido (casi un 40%). Este dato indica que las neuronas del Área A5 parecen estar implicadas en el aumento de la frecuencia respiratoria durante la activación de la SGPdI.

Con respecto a la respuesta cardiovascular se observó que tras la microinyección de Muscimol se produjo un menor incremento de presión arterial (casi un 20%) y de frecuencia cardíaca (más del 85%).

Los resultados obtenidos sugieren que los somas de la región del Área A5 parecen participar tanto en la respuesta cardiovascular como la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI.

Hasta este momento existían una gran cantidad de trabajos que han puesto de manifiesto la participación del Área A5 en la modulación de la actividad cardiorrespiratoria mediante proyecciones hacia un gran número de núcleos del cerebro anterior y del bulbo espinal (Byrum y Guyenet, 1987; Loewy cols., 1979, 1986; Smith y cols, 1988; Strack y cols., 1989; Kwiat y Basbaum, 1990; Huangfu, Koshiya y Guyenet 1991; Nuñez-Abades y cols, 1993; Clark y Proudfit, 1993; Bajic y Proudfit, 1999), pero no han señalado la función de esta región en la modulación de la respuesta cardiorrespiratoria de la SGPdI.

Con este grupo de experimentos se ha demostrado que los somas del Área A5 pueden participar o modular la respuesta cardiorrespiratoria

evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Estos datos se describen por primera vez en este trabajo.

Los datos obtenidos con técnicas morfológicas muestran el elevado número de conexiones que presenta el Área A5 y cómo cada una de ellas proyecta de forma particular a regiones específicas que intervienen en el control cardiorrespiratorio (Byrum y Guyenet, 1987; Loewy cols., 1979, 1986; Smith y cols, 1988; Strack y cols., 1989; Kwiat y Basbaum, 1990; Huangfu, Koshiya y Guyenet 1991; Nuñez-Abades y cols, 1993; Clark y Proudfit, 1993; Bajic y Proudfit, 1999). En este sentido, nuestros resultados completan y aclaran algunas de las cuestiones planteadas desde hace tiempo. Por otra parte, los datos no permiten demostrar ni excluir que otras regiones de la protuberancia o del tronco del encéfalo participen en esta respuesta. Sí se puede inferir que el Área A5 participa en la modulación del reflejo barorreceptor probablemente a nivel del NTS.

Para demostrar la interrelación entre el Área A5 y el NTS, son necesarios, sin embargo, otro tipo de estudios que no han sido objeto de este trabajo. Este enfoque permitirá abrir nuevas líneas de investigación en esa dirección.

5.5. Efecto de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl

Una vez conocida la participación de los somas del Área A5 en la respuesta de defensa, se realizó un grupo de experimentos con el propósito de conocer cuál podría ser el posible papel de la neurotransmisión glutamatérgica en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria a la estimulación de la SGPdl. Para ello, se realizaron microinyecciones de Kinurénico (50-100 nl, 5-10 nmol), antagonista inespecífico de receptores de aminoácidos excitadores, en el Área A5. La dosis empleada fue elegida consultando diversas fuentes bibliográficas (Goodchild y cols., 1982; Lipski y cols., 1988; Jhamandas y Harris, 1992), utilizando la que experimentalmente produce el bloqueo completo de la neurotransmisión en la región (Jhamandas y Harris, 1992).

Después de la microinyección de Kinurénico en el Área A5 se produjo un incremento significativo de la frecuencia respiratoria y el tiempo espiratorio de reposo.

Los datos demostraron que la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica significativamente tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5 (disminuye cerca de un 40%).

La respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de Kinurénico en el Área A5. Se produce un menor aumento de la presión arterial y se abole prácticamente el incremento de frecuencia cardíaca evocado por estimulación eléctrica de la SGPdl.

Estos resultados sugieren que el glutamato parece ser uno de los neurotransmisores implicados, en la región del Área A5, en la modulación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Estos datos se describen por primera vez en este trabajo.

Una vez conocido el papel del glutamato en el Área A5 sobre la respuesta a la estimulación de la SGPdl se realizaron otro grupo de experimentos para intentar dilucidar concretamente qué tipo de receptores de glutamato, ionotrópicos, NMDA o no NMDA, o metabotrópicos, podrían estar involucrados en esta modulación y cuál es la contribución de cada uno de ellos a la respuesta desde el SGPdl.

Ya ha sido descrita con anterioridad por diversos autores la participación de receptores NMDA y no NMDA en la neurotransmisión glutamatérgica para la modulación de las funciones autonómicas (Jhamandas y Harris, 1992b; Zidichouski y Jhamandas, 1993; Zidichouski y cols., 1996; Dutchmann y Herbert, 1998a).

5.6. Efecto de la microinyección de DAP5 en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl

El propósito de este grupo de experimentos era conocer el papel de los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA en la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Para ello se realizaron microinyecciones de DAP5 (50-100 nl, 0.1-0.2 nmoles), antagonista específico de receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA, en el Área A5. La dosis empleada fue elegida tomando de referencia diversas fuentes bibliográficas (Goodchild y cols., 1982; Lipski y cols., 1988; Chan y cols., 1998; Puma C y Bizot JC, 1998; Len y Chan, 1999; McKenna JE y Melzack R, 2001).

Después de la microinyección de DAP5 en el Área A5 se produjo un aumento significativo en el tiempo espiratorio. En las demás variables cardiorrespiratorias no hay cambios en sus niveles de reposo.

Los datos demostraron que la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl no se modifica tras la microinyección de DAP5 en el Área A5.

Con respecto a la respuesta cardiovascular, se produjo un menor incremento de presión arterial (10%) y de la frecuencia cardíaca (80%). Los datos demostraron, por tanto, que la respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de DAP5 en el Área A5.

Con este grupo de experimentos hemos demostrado que los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA del Área A5 no

intervienen en la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Sin embargo, sí parecen modular la respuesta cardiovascular.

Algunos estudios sugieren que el receptor de glutamato NMDA podría tener un importante papel en la regulación de la actividad simpática desde la médula espinal (Mills y cols., 1988; Bazil y Gordon, 1990; 1991; 1993; Hong y Henry, 1992), pero no ha sido descrita la función de estos receptores dentro del Área A5, sobre la regulación de la respuesta cardiovascular de la SGPdl.

5.7. Efecto de la microinyección de CNQX en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl

El propósito de este grupo de experimentos era conocer el posible papel de los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo no NMDA en la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Para ello se realizaron microinyecciones de CNQX (50-100 nL, 50-100 nmol), antagonista específico de receptores de glutamato no NMDA, en el Área A5. La dosis empleada fue elegida consultando diversas fuentes bibliográficas (Goodchild y cols., 1982; Lipski y cols., 1988; Jhamandas y Harris, 1992; Dutschmann y Herbert, 1998; Chan y cols., 1998; Len y Chan, 1999).

Después de la microinyección de CNQX en el Área A5 se produjo, en reposo, un incremento significativo de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca.

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se modifica tras la microinyección de CNQX en el Área A5. Concretamente, se produce un menor aumento de frecuencia respiratoria (20%). Con respecto a la respuesta cardiovascular se produjo un menor incremento de presión arterial (10%) y de frecuencia cardíaca (50%) tras la microinyección de CNQX en el Área A5.

Con este grupo de experimentos hemos demostrado que los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo no NMDA del Área A5 intervienen en la modulación tanto de la respuesta respiratoria como de la respuesta cardiovascular evocadas por estimulación eléctrica de la SGPdl.

5.8. Efecto de la microinyección de MCPG en el Área A5 sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl

El propósito de este grupo de experimentos era conocer el posible papel de los receptores de glutamato metabotrópicos en la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl. Para ello se realizaron microinyecciones de MCPG (50-100 nl, 0.5-1 nmol), antagonista no selectivo (general) de receptores de glutamato metabotrópicos, en el Área A5. La dosis empleada fue elegida consultando diversas fuentes bibliográficas (Hayashi y cols., 1994; Li y Nattie. 1995; Wang y McGinty, 1996).

Después de la microinyección de MCPG en el Área A5 no se produjo ningún cambio significativo en los valores de reposo.

La respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl no se modificó tras la microinyección de MCPG en el Área A5.

Con respecto a la respuesta cardiovascular, ésta se modifica tras la microinyección de MCPG en el Área A5. El aumento de presión arterial y de frecuencia cardíaca se reducen tras la microinyección de MCPG en el Área A5 (15 y 50% respectivamente).

Estos resultados sugieren que los receptores de glutamato metabotrópicos del Área A5 parecen estar implicados fundamentalmente en la modulación de la respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl.

Este trabajo presenta una gran importancia puesto que no existen estudios que demuestren que la neurotransmisión sináptica del Área A5 esté mediada por glutamato. Describimos por primera vez la función de estos receptores en la modulación de la respuesta cardiovascular evocada por estimulación de la SGPdI.

5.9. Hipótesis derivadas de los resultados

La tabla 5.12.I muestra un resumen de los resultados obtenidos. En ella se muestra el efecto de la microinyección de los diferentes fármacos sobre la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl.

El efecto de las microinyecciones de todos los fármacos utilizados en la respuesta de la SGPdl permite concluir que, a nivel respiratorio, las neuronas del Área A5 parecen estar implicadas en los mecanismos de regulación de la intensidad de la actividad inspiratoria (volumen corriente). Durante la estimulación de la SGPdl tras la microinyección de Muscimol la presión pleural inspiratoria disminuye su amplitud. Pero, aunque este efecto sea evidente, no parece ser que el glutamato sea el neurotransmisor implicado en el control de la intensidad de la actividad inspiratoria porque en los experimentos llevados a cabo con antagonistas de glutamato, tanto el Kinurénico (general) como los más específicos (CNQX, DAP5 y MCPG) no provocan ningún cambio en esa actividad. Por otra parte, sí es evidente, por lo resultados, que tanto el Muscimol como el Kinurénico y el CNQX en el Área A5 disminuyen la respuesta respiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl, corroborando la participación del Área A5 en la modulación de esta respuesta.

Otro aspecto a destacar es que se aprecia una disminución en la frecuencia respiratoria de reposo debida a un aumento del tiempo espiratorio. En el caso del bloqueo con Muscimol este aumento no es significativo y sí lo es en el caso de Kinurénico. La disminución de frecuencia respiratoria de reposo parece estar en contradicción con datos de trabajos previos de nuestro grupo en los que tras la aplicación de glutamato en el Área A5 se producía disminución de frecuencia respiratoria por aumento del tiempo espiratorio (Dawid Milner y cols.,

2001). Coles y Dick al microinyectar muscimol en el Área A5 observaron que la respuesta de disminución de frecuencia respiratoria posthipóxica desaparece. Schlenker y Prestbo en 2003 obtienen resultados similares pero con lesiones electrolíticas. Es más, Hilaire en 2006 afirma que el Área A5 modula la frecuencia respiratoria a nivel del Grupo Respiratorio Ventral, reduciendo su actividad mediante la activación de receptores alfa 2, por lo que la inhibición del Área A5 hace que el GRV aumente la frecuencia respiratoria por desinhibición. Esto significa que los resultados son similares inhibiendo o excitando el Área A5.

En conclusión, nuestros datos parecen indicar que el bloqueo del Área A5 con muscimol o el bloqueo de la actividad glutamatérgica con Kinurénico producen una disminución de la frecuencia respiratoria en reposo, lo que sugiere que esta zona mantiene un tono excitador de base sobre los mecanismos que regulan la frecuencia respiratoria, y que se localizan en ratas en el GRV. La disminución de la frecuencia respiratoria podría deberse, en condiciones de reposo, a que la actividad tónica del Área A5 mantiene un cierto tono excitador sobre mecanismos quimiorreceptores de control respiratorio. Este tono es distinto o sigue vías diferentes a las de la estimulación quimiorreceptora directa producida por estimulación de la SGPdI y observada a nivel del NTS por Silva Carvalho y cols. (1995). De esta forma el Área A5 podría actuar manteniendo un tono excitador sobre otras regiones de control respiratorio a nivel bulbar. Se necesitan nuevos trabajos neurofarmacológicos y electrofisiológicos en esta línea para confirmar esta hipótesis lo que permite abrir nuevas líneas de investigación derivadas de esta tesis doctoral.

Por otra parte, a nivel cardiovascular, nuestros resultados sugieren que la respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI está mediada, aunque en diferente medida, por la activación de

receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA, no NMDA y, a más largo plazo, por metabotrópicos en el Área A5. Las acciones de los aminoácidos excitadores son mediadas por ambos tipos de receptores de glutamato, ionotrópicos y metabotrópicos (Seeburg, 1993). Los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos coexisten en las neuronas del A5 como ya se han descrito en otras regiones cerebrales (Mereu y cols., 1991; Miller y Felder, 1988; Wuarin y Dudek, 1991).

De hecho, aunque no es una zona en la que se haya estudiado en profundidad la distribución de subtipos de receptores glutamatérgicos, se sabe que las neuronas del Área A5 poseen receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. Los ionotrópicos del tipo NMDA están conformados por las subunidades NR1-NR2D (Guthmann y Herbert, 1999), dentro de los del tipo no-NMDA hay tanto AMPA como Kainato (Petrália RS y cols., 2000; Wisden y cols., 2000) y dentro de los receptores metabotrópicos, los más abundantes son los del tipo mGluR I, II y III (Shigemoto R y Mizuno N, 2000).

Además de los receptores de glutamato anteriormente descritos, también se han encontrado otra serie de receptores como son los receptores α_{2A} y α_{2C} (adrenérgicos), $GABA_B R_1$ y R_2 (gabaérgicos), receptor μ (opioides) y NK_1 (sustancia P) (Lee A y cols., 1998; Pinto M y cols., 2003; Burman K y cols., 2003; Nattie E y Li A, 2006). Estos datos inmunohistoquímicos permiten abrir nuevas líneas de investigación sobre el papel del Área A5 en la modulación cardiorrespiratoria.

Por tanto, no podemos descartar la posibilidad de que, además de los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos también estén involucrados en la respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl otro tipo de receptores. Esto explicaría que los efectos cardiovasculares característicos de esta respuesta no se abolen

totalmente, sino que se reducen tras la microinyección de los antagonistas específicos de receptores ionotrópicos y metabotrópicos.

Aparte de lo anteriormente descrito, existen evidencias que demuestran que determinadas concentraciones de glutamato pueden producir una actividad neuronal máxima por la estimulación específica de receptores ionotrópicos. En esta situación, los efectos del glutamato sobre receptores metabotrópicos sólo se verían después del bloqueo de los receptores ionotrópicos (Foley y cols., 1998). La estimulación eléctrica de la SGPdl, podría liberar una cantidad suficiente de glutamato como para saturar los receptores ionotrópicos del Área A5 y sólo se activarían los receptores metabotrópicos cuando los ionotrópicos se encontraran inhibidos.

Con respecto a la expresión de subunidades de receptores NMDA, la diversidad de subunidades y formas en las que éstas se unen para formar distintos tipos de receptores NMDA pentaméricos, confiere a estos receptores una gran heterogeneidad funcional. Por esta razón los receptores NMDA pueden ser muy diferentes en cuanto a las propiedades fisiológicas y farmacológicas del canal (Feldmeyer y Cull-Candy, 1996). Estas diferencias se manifiestan en la afinidad al glutamato y en la sensibilidad a glicina, coagonista crucial para la eficacia del glutamato (Kemp y Leeson, 1993). Los receptores NMDA del Área A5 están formados por subunidades NR1 y NR2D (Guthmann y Herbert, 1999) lo que les confiere unas propiedades electrofisiológicas únicas, que se caracterizan por presentar un largo período de desactivación y, por tanto, una baja afinidad por el glutamato (Feldmeyer y Cull-Candy, 1996; Kuner y Schopfer, 1996). Este tipo de receptores tienen menor afinidad por el glutamato que los que contienen las subunidades NR2A-C y el bloqueo por iones Mg^{+} es muy débil comparativamente con los anteriores. Esto último les hace ser bastante independientes de una posible depolarización

previa por parte de canales AMPA/Kainato que retiren el Mg^{+} y que permitan el flujo de Ca^{+} y Na^{+} .

Por todo lo anterior, tras el análisis de la distribución de receptores de glutamato en el Área A5, de las características que los definen, y de los resultados que hemos obtenido, podemos deducir que la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl está mediada por la activación de receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA, no NMDA y metabotrópicos.

Para analizar la influencia de cada uno de ellos en la respuesta cardiorrespiratoria a la estimulación de la SGPdl hay que tener en cuenta que las dosis utilizadas de las distintas sustancias no son equiparables (sólo lo serían en caso de haber utilizado curvas dosis-respuesta), por lo que no podemos comparar numéricamente los resultados de unas sustancias con respecto a las demás. Aun así, las dosis utilizadas están bien establecidas en la literatura por lo que se considera que son las más efectivas. Este dato permite establecer ciertas comparaciones entre las distintas respuestas.

Con respecto a los experimentos en los que se microinyecta Kinurénico, la respuesta cardiovascular evocada por estimulación eléctrica de la SGPdl se caracteriza por un menor incremento de presión arterial y una fuerte disminución del incremento de frecuencia cardíaca evocada por la estimulación control. Si contrastamos estos resultados con aquellos obtenidos mediante la microinyección de los antagonistas específicos de receptores de glutamato ionotrópicos, podemos concluir que, en el Área A5, tanto los receptores NMDA como los receptores no-NMDA median parcialmente el cambio de frecuencia cardíaca y de presión arterial. A esto hay que añadir que la respuesta cardíaca también depende de la activación de receptores de glutamato metabotrópicos, ya

que cuando los bloqueamos con MCPG la respuesta de frecuencia cardiaca disminuye de una forma considerable mientras que la respuesta presora se modifica, pero en menor cuantía.

Ante estos resultados se plantean las siguientes hipótesis:

1.- El bloqueo de la neurotransmisión general por Muscimol, el de los receptores de glutamato por el Kinurénico y el de los receptores del tipo no-NMDA por CNQX tienen el mismo efecto respiratorio. Disminuyen el aumento de frecuencia respiratoria evocada tras la estimulación eléctrica de la SGPdI, corroborando la participación del Área A5 en la modulación de esta respuesta.

Además, con Kinurénico se produce una disminución de la frecuencia respiratoria en reposo, lo que parece indicar que esta zona mantiene un tono excitador de base sobre los mecanismos que regulan la frecuencia respiratoria del GRV. Este efecto podría deberse a una actividad tónica excitadora del Área A5 sobre mecanismos quimiorreceptores de control respiratorio.

2.- Tanto el Kinurénico (antagonista general) como los antagonistas específicos disminuyen la respuesta presora. Además, excepto con Kinurénico, la microinyección del resto de antagonistas aumenta la presión arterial basal. Por tanto, los resultados obtenidos en la respuesta presora evocada por estimulación de la SGPdI tras las distintas microinyecciones, probablemente sean debidos a la inhibición del tono excitador que ejercen las neuronas del Área A5 sobre los mecanismos de inhibición del reflejo barorreceptor a nivel del NTS. No podemos descartar conexiones con otros núcleos troncoencefálicos implicados en el control cardiovascular con los que el Área A5 presenta proyecciones pero de menor densidad.

3.- La disminución de la respuesta presora obtenida en todos los experimentos podría ser consecuencia de la disminución o abolición del incremento de la frecuencia cardíaca. La inhibición del componente cardíaco del reflejo barorreceptor por activación de receptores NMDA y no NMDA en el Área A5 tiene como consecuencia una disminución de la respuesta presora. No podemos descartar, por otra parte, que en algunos casos la disminución de la respuesta presora pueda deberse al incremento de la presión arterial de reposo obtenido tras la microinyección de alguno de los fármacos. Este incremento de niveles basales de presión arterial hace que la estadística considere significativamente menor el incremento en valor absoluto de presión arterial ya que, en la mayoría de los casos, los valores máximos de ésta se mantienen constantes.

Por consiguiente, los cambios obtenidos en la respuesta presora pueden ser un efecto indirecto de la microinyección del fármaco, que incrementa los valores de reposo de presión arterial, o de la inhibición del componente cardíaco del reflejo barorreceptor durante la estimulación eléctrica de la SGPdI, y no un efecto directo de las neuronas del Área A5 sobre la respuesta presora evocada por estimulación eléctrica de la SGPdI.

4.- El efecto que tiene el Kinurénico sobre la respuesta cardíaca (aboliéndola casi totalmente) es muy parecido al del antagonista de los receptores NMDA (DAP5). Aunque también hay que tener en cuenta que el antagonista de receptores no-NMDA (CNQX) y metabotrópicos (MCPG) disminuyen de manera importante la respuesta, aunque de manera no tan intensa como los anteriores.

Por tanto, podemos decir que nuestros resultados demuestran que todos los tipos de receptores de glutamato están involucrados en la

respuesta cardiaca evocada por estimulación de la SGPdl, y que los que más influencia tienen de todos ellos, son los NMDA.

EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN SOBRE LOS VALORES DE REPOSO					
	PA (mmHg)	FC (cpm)	FR (rpm)	Ti (s)	Te (s)
MUSCIMOL	NS	NS	NS	NS	Aumenta (*)
KINURENICO	NS	NS	Disminuye (*)	NS	Aumenta (**)
CNQX	Aumenta (***)	Aumenta (***)	NS	NS	Aumenta (***)
DAP5	NS	NS	NS	NS	Aumenta (*)
MCPG	NS	NS	NS	NS	NS

EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN SOBRE LA RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DE LA SGPdI					
	PA (mmHg)	FC (cpm)	FR (rpm)	Ti (s)	Te (s)
MUSCIMOL	Disminuye (*)	Disminuye (***)	Disminuye (**)	Aumenta (*)	NS
KINURENICO	Disminuye (*)	Disminuye (**)	Disminuye (*)	NS	NS
CNQX	Disminuye (*)	Disminuye (***)	Disminuye (**)	NS	NS
DAP5	Disminuye (*)	Disminuye (**)	NS	NS	NS
MCPG	Disminuye (*)	Disminuye (**)	NS	NS	NS

TABLA 5.12.I: Resumen de resultados obtenidos tras la microinyección de los distintos fármacos en el Área A5 sobre los valores cardiorrespiratorios de reposo y sobre la respuesta cardiorrespiratoria a la estimulación eléctrica de la SGPdI. Las iniciales corresponden a: **PA:** presión arterial; **FC:** frecuencia cardiaca; **FR:** frecuencia respiratoria; **Ti:** tiempo inspiratorio; **Te:** tiempo espiratorio; **NS:** no significativo. Los valores de p son: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Confirmamos que la microestimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral produce una respuesta cardiorrespiratoria caracterizada por aumento de la frecuencia respiratoria, aumento de presión arterial y aumento de frecuencia cardíaca con valores muy significativos con respecto a la situación de control.
2. El bloqueo de la actividad neuronal mediante la microinyección “*in situ*” del agonista gabaérgico Muscimol en el Área A5 reduce el incremento de las respuestas respiratoria, de presión arterial y de frecuencia cardíaca evocadas por la microestimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral. Estos datos sugieren que los somas del Área A5 participan en la modulación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por la microestimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.
3. El bloqueo inespecífico de receptores de glutamato mediante la microinyección “*in situ*” de Ácido Kinurénico en el Área A5 reduce el incremento de las respuestas respiratoria y cardiovascular evocadas por la microestimulación eléctrica del Área de Defensa Hipotalámica. Estos datos sugieren la participación del glutamato en la modulación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por la microestimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.
4. El bloqueo específico de receptores ionotrópicos (NMDA y no-NMDA) y metabotrópicos de glutamato mediante microinyección “*in situ*” de DAP5, CNQX y MCPG en el Área A5, respectivamente, modifica las respuestas respiratoria y cardiovascular evocadas por la microestimulación eléctrica del Área de Defensa Hipotalámica,

reduciéndolas, sugiriendo la participación de estos subtipos de receptores de glutamato en la modulación de dicha respuesta.

Conclusión final

Los resultados obtenidos demuestran por primera vez la relación neurofarmacológica y, por tanto, funcional, entre la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral y la región protuberancial A5 en el control central cardiorrespiratorio y sugieren la participación del glutamato en dichas interrelaciones.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbott SB, Kanbar R, Bochorishvili G, Coates MB, Stornetta RL y Guyenet PG. The Journal of Physiology Neuroscience C1 neurons excite locus coeruleus and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. J Physiol 590.12. 2897–2915. 2012.

Abrahams VC, Hilton SM y Zbrozyna AW. Active muscle vasodilation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defence reaction. J Physiol 154: 491-513. 1960.

Akil H, Richardson DE, Hughes J y Barchas JD. Enkephalin-like material elevated in ventricular cerebro-spinal fluid of pain patients after analgetic focal stimulation. Science 201: 463– 465. 1978.

Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure LS, Penney JB y Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. Neurosci Lett. 118: 112–115. 1990.

Allen GV y Cechetto DF. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic Área: I. Descending projections. J Comp Neurol 315: 313-332, 1992.

Allen GV y Cechetto DF. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic Área: II. Ascending projections. J Comp Neurol 330: 421-438, 1993.

Allen GV y Pronych SP. Trigeminal autonomic pathways involved in nociception-induced reflex cardiovascular responses. Brain Res 754: 269-78. 1997.

Allen GV, Saper CB, Hurley KM y Cechetto DF. Organisation of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 311, pp: 1-16, 1991.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U y Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23(2): 185-8. 1999.

An X, Bandler R, Öngür D y Price JL. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 401: 455–479. 1998.

Armstrong DM, Ross CA, Pickel VM, Joh TH y Reis DJ. Distribution of dopamine-, noradrenaline-, and adrenaline-containing cell bodies in the rat medulla oblongata: demonstrated by the immunocytochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes. *J Comp Neurol* 212: 173–187. 1982.

Arthur JM, Bonham AC, Gitterman DD, Gebhart GF, Marcus ML y Brody MJ. Coronary vasoconstriction during stimulation in hypothalamic defense region. *Am J Physiol* 260 pp: R335-R345, 1991.

Azevedo AD y Vêras-Silva AS. Patterns of cardiovascular and respiratory responses evoked by stimulation of the defense Área in the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). *Braz J Med Biol Res* 20(6): 845-50. 1987.

Azkue JJ, Knopfel T, Kuhn R, Mateos JM y Grandes P. Distribution of the metabotropic glutamate receptor subtype mGluR5 in rat midbrain periaqueductal grey and relationship with ascending spinofugal afferents. *Neurosci. Lett* 228: 1–4. 1997.

Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. Clin Exp Pharmacol Physiol 28: 95–99. 2001.

Bajic D y Proudfit HK. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. J Comp Neurol 405(3): 359-79. 1999.

Bajic D, Bockstaele EJ y Proudfit HK. Ultrastructural analysis of rat ventrolateral periaqueductal gray projections to the $\alpha 5$ cell group. Neuroscience 224: 145–159. 2012.

Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, Johnson RA, Watters JJ y Mitchell GS. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. Nat Neurosci 7(1): 48-55. 2004.

Bandler R y Shipley MT. Columnar organization of the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression. Trends Neurosci. 17: 379–389. 1994.

Bandler R, Keay KA, Floyd N y Price J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. Brain Res Bull 53: 95–104. 2000.

Bandler R. Induction of rage following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. Neurosci Lett 30: 183-188. 1982.

Barbaresi, P. GABA-immunoreactive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. J Neurocytol 34: 471–487. 2005.

Barbaresi P. Postnatal development of GABA-immunoreactive neurons and terminals in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 518: 2240–2260. 2010.

Barman SM. Descending projections of hypothalamic neurons with sympathetic nerve-related activity. *J Neurophysiol* 64(3): 1019-32. 1990.

Baskin DS, Mehler WR, Hosobuchi Y, Richardson DE, Adams JE y Flitter MA. Autopsy analysis of the safety, efficacy and cartography of electrical stimulation of the central gray in humans. *Brain Res*; 371: 231–236. 1986.

Basnayake SD, Green AL y Paterson DJ. Mapping the central neurocircuitry that integrates the cardiovascular response to exercise in humans. *Exp Physiol* 97: 29–38. 2012.

Basnayake SD, Hyam JA, Pereira EA, Schweder PM, Brittain JS, Aziz TZ, Green AL y Paterson DJ. Identifying cardiovascular neurocircuitry involved in the exercise pressor reflex in humans using functional neurosurgery. *J Appl Physiol* 110: 881–891. 2011.

Bauer RM, Vela MB, Simon T y Waldrop TG. A GABAergic mechanism in the posterior hypothalamus modulates baroreflex bradycardia. *Brain Res Bull* 20: 633-641, 1988.

Bechara A, Damasio H, Tranel D y Damasio AR. Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. *Science* 275: 1293–1295. 1997.

Beckett SR, Asply S, Graham M y Marsden CA. Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Psychopharmacology* 127: 384–390. 1996.

Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46: 575–605. 1995.

Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD y Ennis M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain* 40: 195–204. 1990.

Beitz AJ, Mullett MA y Weiner LL. The periaqueductal gray projections to the rat spinal trigeminal, raphe magnus, gigantocellular pars alpha and paragigantocellular nuclei arise from separate neurons. *Brain Res.* 288: 307–314. 1983.

BeMent SL y Ranck JB Jr. A model for electrical stimulation of central myelinated fibers with monopolar electrodes. *Exp Neurol* 24(2): 171-86. 1969.

Benarroch EE. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clin Auton Res* 15: 254–263. 2005.

Benarroch EE, Schmeichel AM, Dugger BN, Sandroni P, Parisi JE, y Low PA. Dopamine cell loss in the periaqueductal gray in multiple system atrophy and Lewy body dementia. *Neurology* 73:106 –112. 2009.

Benarroch EE, Schmeichel AM, Low PA y Parisi JE. Differential involvement of the periaqueductal gray in multiple system atrophy. *Auton Neurosci* 158: 111–117. 2010.

Benarroch EE, Schmeichel AM, Phillip A, Sandroni LP y Parisi JE. Loss of A5 noradrenergic neurons in multiple system atrophy *Acta Neuropathol.* 115: 629–634. 2008.

Benzinger H y Massopust LC. Brain stem projections from cortical Área 18 in the albino rat. Exp. Brain Res. 50: 1–8. 1983.

Bernard JF, Netzer F, Gau R, Hamon M, Laguzzi R, Sévoz-Couche C. Critical role of B3 serotonergic cells in baroreflex inhibition during the defense reaction triggered by dorsal periaqueductal gray stimulation. J Comp Neurol. Jan 506(1):108-21. 2008

Bernard JF, Peschanski M y Besson JM. Afferents and efferents of the rat cuneiformis nucleus: an anatomical study with reference to pain transmission. Brain Res. 490: 181–185. 1989.

Bertrand F y Hugelin A. Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanism. J Neurophysiol 34: 189-207. 1971.

Bertrand F, Hugelin A y Vibert JF. Quantitative study of anatomical distribution of respiration related neurons in the pons. Exp Brain Res 16: 383-399, 1973.

Bester H, Besson JM y Bernard JF. Organization of efferent projections from the parabrachial Área to the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J. Comp. Neurol. 383: 245–281. 1997.

Bittencourt, A.S., Carobrez, A.P., Zamprogno, L.P., Tufik, S., Schenberg, L.C., Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. Neuroscience 125: 71–89. 2004.

Bittencourt AS, Nakamura-Palacios EM, Mauad H, Tufik S y Schenberg LC. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors

within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 133: 873–892. 2005.

Bjorkeland M y Boivie J. An anatomical study of the projections from the dorsal column nuclei to the midbrain in cat. *Anat. Embryol.* 170: 29–43. 1984.

Blanchard DC, Canteras NS, Markham C.M, Pentkowski NS y Blanchard RJ. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a cat, cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 1243–1253. 2005.

Blanchard RJ y Blanchard D.C. An ethoexperimental approach to the study of fear. *Psychol. Record.* 37: 305–316. 1987.

Blanchi B y Sieweke MH. Mutations of brainstem transcription factors and central respiratory disorders. *Trends Mol Med.* Jan 11(1): 23-30. Review. 2005.

Blessing WW, Goodchild AK, Dampney RA y Chalmers JP. Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord, with special reference to catecholamine-containing neurons. *Brain Res* 221(1): 35-55. 1981.

Blessing WW, Howe PRC, Joh TH, Oliver JR y Willoughby JO. Distribution of tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y-like immunoreactive neurones in rabbit medulla oblongata, with attention to colocalization studies, presumptive adrenaline-synthesizing perikarya, and vagal preganglionic cells. *J Comp Neurol* 248: 285–300. 1986.

Bolme P, Ngai SH, Uvnäs B y Wallenberg LR. Circulatory and behavioural effects on electrical stimulation of the sympathetic vasodilator Áreas in the

hypothalamus and the mesencephalon in unaesthetized dogs. *Acta Physiol Scand* 70: 334-346, 1967.

Bonham AC, Gutterman DD, Arthur JM, Marcus ML, Gebhart GF y Brody MJ. Neurogenic regulation of coronary blood flow: evidence for a central nervous system pathway. *Circ Res* 61 Suppl. II: II-42-II-46, 1987.

Borday V, Foutz AS, Nordholm L y Denavit-Saubié M. Respiratory effects of glutamate receptor antagonists in neonate and adult mammals. *Eur J Pharmacol.* 348(2-3): 235-46. 1998.

Bouton ME, Mineka S y Barlow DH. A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. *Psychol Rev*; 108:4 –32. 2001.

Braak H, Rub U, Sandmann-Keil D y cols. Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol* 99: 489–495. 2000.

Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VG, Cavalcante JC, Wirth J, Sena-Esteves M y Saper CB. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol.* Jun 15; 520 (9): 1985-2001. 2012.

Bunag RD, Eferakeya AE y Langdon DS. Enhancement of hypothalamic pressor responses in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 228: 217-222. 1975.

Burman KJ, Ige AO, White JH, Marshall FH, Pangalos MN, Emson PC, Minson JB y Llewellyn-Smith IJ. GABAB receptor subunits, R1 and R2, in brainstem catecholamine and serotonin neurons. *Brain Res* 970(1-2): 35-46. 2003.

Burnett A y Gebhart GF. Characterization of descending modulation of nociception from the A5 cell group. *Brain Res* 546(2): 271-81. 1991.

Byrum CE y Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J. Comp. Neurol* 261: 529-42, 1987.

Byrum CE, Stornetta R y Guyenet PG. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Res* 303: 15–29, 1984.

Cameron AA, Khan IA, Westlund KN y Willis WD. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgarisleucoagglutinin study. II. Descending projections. *J. Comp. Neurol.*, 351: 585–601.1995.

Cann-Moisan C, Girin E, Giroux JD, Le Bras P y Caroff J. Changes in cerebrospinal fluid monoamine metabolites, tryptophan, and gamma-aminobutyric acid during the 1st year of life in normal infants. comparison with victims of sudden infant death syndrome. *Biol Neonate* 75(3): 152-9. 1999.

Canteras NS y Goto M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport* 10: 413–418. 1999.

Canteras NS y Swanson LW. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10089–10093. 1992.

Cao WH, Fan W, y Morrison SF. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* 126: 229–240, 2004.

Caous CA, de Sousa Buck H y Lindsey CJ. Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory functions. *Auton Neurosci* 94(1-2): 14-24. 2001.

Card JP, Sved JC, Craig B, Raizada M, Vazquez J y Sved AF. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol* 499, 840–859. 2006.

Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res.* 58: 27–47. 1993.

Carrive P y Bandler R. Viscerotropic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal gray: A correlative functional and anatomical study. *Brain Res* 541: 206-215, 1991.

Carrive P y Morgan MM. Periaqueductal gray, In: Mai, J.K., Paxinos, G. (Eds.) *The Human Nervous System*, Third edition. Elsevier, Amsterdam, pp: 368–401. 2012.

Cechetto DF y Saper CB. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272: 579–604. 1988.

Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ y Sawchenko PE. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci* 13: 5126–5138. 1993.

Chan RK y Sawchenko PE. Spatially and temporally differentiated patterns of c-fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *J Comp Neurol* 348: 433–460. 1994.

Chan RK y Sawchenko PE. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci* 18: 371–387. 1998b.

Chen RZ, Akbarian S, Tudor M y Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27(3): 327-31. 2001.

Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R y Greenberg ME. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302(5646): 885-9. 2003.

Ciriello J y Calaresu FR. Role of paraventricular and supraoptic nuclei in central cardiovascular regulation in the cat. *Am J Physiol* 239: 137-R142, 1980.

Ciriello J, Kline RL, Zhang TX y Caverson MM. Lesions of the paraventricular nucleus alter the development of spontaneous hypertension in the rat. *Brain Res* 310(2): 355-9. 1984.

Clark FM y Proudfit HK. The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulated nociception. *Brain Res* 616: 200-210, 1993.

Clascá F, Llamas A y Reinoso-Suárez F. Hypothalamic connections of the insular cortex in the cat. *Brain Res* 490(2): 361-6. 1989.

Close JM, Neil JJ y Loewy AD. Actions of Nmethyl-aspartate and its antagonist aminophosphono-valerate on the A5 catecholamine cell group in rat. *Brain Research* 249: 393-396. 1982.

Cobos A, Lima D, Almeida A y Tavares I. Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience* 120(2): 485-98. 2003.

Coles SK y Dick TE. Neurones in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. *J Physiol (Lond)* 497: 79–94, 1996.

Comet MA, Sévoz-Couche C, Hanoun N, Hamon M y Laguzzi R. 5-HT-mediated inhibition of cardiovagal baroreceptor reflex response during defense reaction in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4): H1641-9. 2004.

Conti F, Barbaresi P y Fabri M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 24: 629–633. 1988.

Coote JH. Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biol Signals* 4: 142–149, 1995.

Coote JH, Hilton SM y Pérez-González JF. Inhibition of the barorreceptor reflex on stimulation in the brainstem defence centre. *J Physiol* 288: 545-560, 1979.

Coote JH, Yang Z, Pyner S y Deering J. Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(6): 461-463, 1998.

Cowie RJ y Holstege G. Dorsal mesencephalic projections to pons, medulla, and spinal cord in the cat: limbic and non-limbic components. *J. Comp. Neurol.* 319: 536–559. 1992.

Cravo SL, Morrison SF y Reis DJ. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol* 261: R985–R994. 1991.

Cross BA y Silver IA. Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hipercapnia. *Exp Neurol* 7: 375-393, 1963.

Cucchiario G y Commons KG. Alpha 4 nicotinic acetylcholine receptor subunit links cholinergic to brainstem monoaminergic neurotransmission. *Synapse* 1; 49(3): 195-205. 2003.

Czyzewska- Szafran H, Wutkiewicz M, Remiszewska M, Jastrzebski Z, Czarnecki A y Danysz A. Down-regulation of the GABAergic system in selected brain Areas of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Pol J Pharmacol Pharm* 41: 619-627, 1988.

Da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ y Fontes MAP. Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res.* 984: 206–214. 2003.

Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20(7): 398-9. 1964.

Dampney RAL, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MAP, Potts PD y Polson JW. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol. Scand.* 177: 209–218. 2003.

Dampney RAL, Li YW, Hirooka Y, Potts P y Polson JW. Use of c-fos functional mapping to identify the central baroreceptor reflex pathway: advantages and limitations. Clin Exp Hypert 17: 197–208. 1995.

Dampney RAL, Polson JW, Potts PD, Hirooka Y y Horiuchi J. Functional organization of brain pathways subserving the baroreceptor reflex: studies in conscious animals using immediate early gene expression. Cell Mol Neurobiol 23: 597–616. 2003.

Darlington DN, Shinsako J y Dallman MF. Paraventricular lesions: hormonal and cardiovascular responses to hemorrhage. Brain Res 439(1-2): 289-301. 1988.

Dawid-Milner MS, Silva-Carvalho L y Spyer KM. Hypothalamic modulation of laryngeal reflexes in the anaesthetized cat; role of the nucleus tractus solitarii. J. Physiol 487.3: 739-749, 1995.

Dawid-Milner MS, Lara JP, González-Barón S y Spyer KM. Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetised rat. Eur J Physiol 441: 434-443. 2001.

Dawid-Milner MS, Lara JP, López de Miguel M, López-González MV, Spyer KM, González-Barón S. A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. Brain Research. Vol 982, 108-118. 2003.

De Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MAP y DiMicco JA. Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. J. Physiol. 587: 1201–1215. 2009.

De Oca BM, DeCola JP, Maren S y Fanselow MS. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 18: 3426–3432. 1998.

Dean C y Coote JH. Discharge patterns in postganglionic neurones to skeletal muscle and kidney during activation of the hypothalamic and midbrain defence Areas in the cat. *Brain Res* 377: 271–278, 1986.

Dean P, Redgrave P y Westby GW. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci.* 12: 137–147. 1989.

Di Pasquale E, Monteau R e Hilaire G. In vitro study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp Brain Res* 89(2): 459-64. 1992.

Di Pasquale E, Morin D, Monteau R e Hilaire G. Serotonergic modulation of the respiratory rhythm generator at birth: an in vitro study in the rat. *Neurosci Lett* 143(1-2): 91-5. 1992.

Díaz-Casares A, López-González MV, Peinado-Aragonés CA, Lara JP, González-Barón S, Dawid-Milner MS. Role of the parabrachial complex in the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense Área stimulation in the anesthetized rat. *Brain Research*, Vol 1279, 58-70. 2009.

Díaz-Casares A, López-González MV, Peinado-Aragonés C, González-Barón S, Dawid-Milner MS. Parabrachial complex glutamate receptors modulate the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense Área. *Autonomic Neuroscience*, Vol 169 (2), 124-134. 2012.

Dick TE y Coles SK. The ventrolateral pons mediates short-term depression of respiratory frequency after brief hypoxia. *Respir Physiol* 121: 87-100. 2000.

Dielenberg RA, Hunt GE y McGregor IS. “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104: 1085–1097. 2001.

Dielenberg RA, Leman S y Carrive P. Effects of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to car odor exposure in rats. *Behav. Brain Res.* 153: 487–496. 2004.

Dillon GH, Shonis CA y Waldrup TG. Hypothalamic GABAergic modulation of respiratory responses to baroreceptor stimulation. *Resp Physiol* 85: 289-304. 1991.

Dillon GH y Waldrup TG. Responses of feline caudal hypothalamic cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *Exp Brain Res* 96: 260-272. 1993.

DiMicco JA, Abshire VM, Hankins KD, Sample RHB y Wible Jr JH. Microinjection of GABA antagonists into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. *Neuropharmacology* 25: 1063– 1066. 1986.

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV y Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 469–480. 2002.

Djojosingito AM, Folkow B, Kylstra PH, Lisander B y Tuttle RS. Differentiated interaction between the hypothalamic defence reaction and

baroreceptor reflexes. I. Effects on heart rate and regional flow resistance. *Acta Physiol Scand* 78: 376-385, 1970.

Do Monte FH, Canteras, NS, Fernandes D, Assreuy J y Carobrez AP. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *J. Neurosci.* 28: 13296–13302. 2008.

Dobbins EG y Feldman JL. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347: 64-86. 1994.

Dragunow M y Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Meth* 29: 261–265. 1989.

Dragunow M y Robertson HA. Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329: 441– 442. 1987.

Drye RG, Baisden RH, Whittington DL y Woodruff ML. The effects of stimulation of the A5 region on blood pressure and heart rate in rabbits. *Brain Res Bull* 24(1): 33-9. 1990.

Duan Y-F, Winters R, McCabe PM, Green EJ, Huan Y y Schneiderman N. Modulation of neuronal firing in the medullary solitary complex by electrical stimulation of the hypothalamic defence and the vigilance Areas in rabbits. *Brain Res* 643: 218-226, 1994.

Durand E, Dauter S, Pattyn A, Gaultier C, Goridis C y Gallego J. Sleep-disordered breathing in newborn mice heterozygous for the transcription factor Phox2b. *Am J Respir Crit Care Med* 172(2): 238-43. 2005.

Eilam R, Malach R, Bergmann F y Segal M. Hypertension induced by hypothalamic transplantation from genetically hypertensive to normotensive rats. *J Neurosci* 11: 401-411, 1991.

Eliasson S, Folkow B, Lindgren P y Uvnas B. Activation of sympathetic vasodilator nerves to the skeletal muscles in the cat by hypothalamic stimulation. *Acta Physiol Scand* 23: 333-351, 1951.

Erickson JT, Brosenitsch TA y Katz DM. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci* 21(2): 581-9. 2001.

Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G y Katz DM. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 16(17): 5361-71. 1996.

Errchidi S, Hilaire G y Monteau R. Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat: an in vitro study. *J Physiol* 429: 497-510. 1990.

Errchidi S, Monteau R y Hilaire G. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. *J Physiol* 443: 477-98. 1991.

Esler M y Kaye D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35 (Supl. 4): S1-S7. 2000.

Esposito A, Demeurisse G, Alberti B y Fabbro F. Complete mutism after midbrain periaqueductal gray lesion. *Neuroreport*; 10: 681– 685. 1999.

Esser MJ, Pronych SP y Allen GV. Trigeminal-reticular connections: possible pathways for nociception-induced cardiovascular reflex responses in the rat. *J Comp Neurol* 391(4): 526-44. 1998.

Fairhurst M, Wiech K, Dunckley P y Tracey I. Anticipatory brainstem activity predicts neural processing of pain in humans. *Pain* 128: 101–110. 2007.

Fang F y Proudfit HK. Spinal cholinergic and monoamine receptors mediate the antinociceptive effect of morphine microinjected in the periaqueductal gray on the rat tail, but not the feet. *Brain Res* 722: 95–108. 1996.

Fang F y Proudfit HK. Antinociception produced by microinjection of morphine in the rat periaqueductal gray is enhanced in the foot, but not the tail, by intrathecal injection of alpha1- adrenoceptor antagonists. *Brain Res* 790: 14–24. 1998.

Feigl EO. Vasoconstriction resulting from diencephalic stimulation. *Acta Physiol Scand* 60: 372-380. 1964.

Felder RB y Mifflin SW. Baroreceptor y chemoreceptor afferent processing in the solitary tract nucleus. In *nucleus of the solitary tract*, ed. Barroco, IRS, pp: 169-185. 1994.

Feldmeyer D y Cull-Candy S. Functional consequences of changes in NMDA receptor subunit expression during development. *J Neurocytol* 25: 857-867. 1996.

Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5: 565–575. 2004.

Fink BR, Katz R, Reinhold H y Schoolman A. Suprapontine mechanism in regulation of respiration. *Am J Physiol* 202: 217-220. 1962.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA y Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J. Comp. Neurol.* 422: 556–578. 2000.

Foley CM, Moffitt JA, Hay M y Hasser EM. Glutamate in the nucleus of the solitary tract activates both ionotropic and metabotropic glutamate receptors. *Am J. Physiol.* 275 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 44): R1858-R1866. 1998.

Folkow B, Lisander B, Tuttle RS y Wang SC. Changes in cardiac output upon stimulation of the hypothalamic defense Área and the medullary depressor Área in the cat. *Acta Physiol Scand* 72: 220-233. 1968.

Fontes MAP, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh S-J y Dampney RAL. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol* 280: H2891–H2901. 2001.

Fontes MAP, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ y Dampney RAL. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Heart Circ. Physiol.* 280: H2891–H2901. 2001.

Forsyth RP. Hypothalamic control of the distribution of cardiac output in the unaesthetized rhesus monkey. *Circ Res* 26: 783-794. 1970.

Foutz AS, Champagnat J y Denavit- Saubié M. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors control respiratory off-switch in cat. *Neurosci Lett* 87: 221-226. 1988a.

Foutz AS, Champagnat J y Denavit- Saubié M. Respiratory effects of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist, MK-801, in intact and vagotomized chronic cats. *Eur J Pharmacol* 154: 179-184. 1988b.

Fowler CJ y Griffiths DJ. A decade of functional brain imaging applied to bladder control. *Neurourol Urodyn* 29: 49 –55. 2010.

Fowler CJ, Griffiths D y de Groat WC. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci* 9: 453– 466. 2008.

Fuchs SAG, Edinger HM y Siegel A. The organization of hypothalamic pathways mediating affective defense behaviors in the cat. *Brain Res* 330: 77-92. 1985.

Fuchs SAG, Edinger HM y Siegel A. The role of the anterior hypothalamus in affective defence behavior elicited from the ventromedial hypothalamus of the cat. *Brain Res* 330: 93-107, 1985.

Fuller PM, Saper CB y Lu J. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol* 584: 735–741. 2007.

Fulwiler CE y Saper CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res. Rev.* 7: 229–259. 1984.

Furlong TM, Horiuchi J, McDowall LM y Dampney RAL. Activation of brain regions in response to airpuff. *Proc. Aust. Neurosci. Soc.* 19: 27. 2009.

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P y Busby SJ. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J. Comp. Neurol.* 492: 145–177. 2005.

Gaultier C, Amiel J, Dauger S, Trang H, Lyonnet S, Gallego J, Simonneau M. Genetics and early disturbances of breathing control. *Pediatr Res* 55(5): 729-33. 2004.

Gaytan SP, Calero F, Núñez-Abades PA, Morillo AM y Pásaro R. Pontomedullary efferent projections of the ventral respiratory neuronal subsets of the rat. *Brain Res Bull* 42: 323-34. 1997.

Gaytan SP y Pásaro R. Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Brain Res. Bull.* 47: 625–642. 1998.

Gaytán SP, Pásaro R, Coulon P, Bevorgut M y Hilaire G. Identification of central nervous system neurons innervating the respiratory muscles of the mouse: a transneuronal tracing study. *Brain Res Bull* 57(3-4): 335-9. 2002.

Gebber GL y Klevans LR. Central nervous modulation of cardiovascular reflexes. *Fed Proc* 31: 1245-1252. 1972.

Gebber GL y Synder DW. Hypothalamic control of baroreceptor reflexes. *Am J Physiol* 218: 214-231. 1969.

Gellhorn E, Nakao H y Redgate ES. The influence of lesions in the anterior and posterior hypothalamus on tonic and phasic autonomic reactions. *J Physiol* 131(2): 402-23. 1956.

Gellman MD, Schneiderman N, Wallach JH y LeBlanc W. Cardiovascular responses elicited by hypothalamic stimulation in rabbits reveal a mediolateral organization. *J Auton Nerv Syst.* 4: 301–317. 1981.

Gelsema AJ, Roe MJ y Calaresu FR. Neuronally mediated cardiovascular responses to stimulation of cell bodies in the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 482, 67–77. 1989.

Goodchild AK, Dampney RAL y Bandler R. A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within a localized regions of the central nervous system. *J Neurosci Methods* 6: 351-363. 1982.

Goodchild AK, Phillips JK, Lipski J y Pilowsky PM. Differential expression of catecholamine synthetic enzymes in the caudal ventral pons. *J Comp Neurol* 438(4): 457-67. 2001.

Goto A, Ikeda T, Tobian L, Iwai J y Johnson MA. Brain lesions in the paraventricular nuclei and catecholaminergic neurons minimize salt hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Clin Sci (Lond)* 61 Suppl 7: 53s-55s. 1981.

Graham JC, Hoffman GE y Sved AF. c-Fos expression in brain in response to hypotension and hypertension in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 55: 92–104. 1995.

Green AL, Wang S, Owen SL, Paterson DJ, Stein JF y Aziz TZ. Controlling the heart via the brain: a potential new therapy for orthostatic hypotension. *Neurosurgery* 58: 1176 –1183. 2006.

Green AL, Wang S, Owen SL, Xie K, Bittar RG, Stein JF, Paterson DJ y Aziz TZ. Stimulating the human midbrain to reveal the link between pain and blood pressure. *Pain*.124: 349–359. 2006.

Green AL, Wang S, Owen SL, Xie K, Liu X, Paterson DJ, Stein JF, Bain PG y Aziz TZ. Deep brain stimulation can regulate arterial blood pressure in awake humans. *Neuroreport* 16: 1741–1745. 2005.

Gregg TR y Siegel A. Differential effects of NK1 receptors in the midbrain periaqueductal gray upon defensive rage and predatory attack in the cat. *Brain Res* 994: 55–66. 2003.

Grindstaff RJ, Grindstaff RR, Sullivan MJ y Cunningham JT. Role of the locus ceruleus in baroreceptor regulation of supraoptic vasopressin neurons in the rat. *Am J Physiol* 279: R306–R319. 2000.

Guo H, Hellard DT, Huang L y Katz DM. Development of pontine noradrenergic A5 neurons requires brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 21(7): 2019-23. 2005.

Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJM y Riley TA. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 264: R1035–R1044. 1993.

Guyenet PG, Stornetta RL, Weston MC, McQuiston T y Simmons JR. Detection of amino acid and peptide transmitters in physiologically identified brainstem cardiorespiratory neurons. *Auton Neurosci* 114(1-2): 1-10. Review. 2004.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 335–346. 2006.

Hall CW y Behbehani, MM. The medial preoptic nucleus of the hypothalamus modulates activity of nitric oxide sensitive neurons in the midbrain periaqueductal gray. *Brain Res.* 765: 208–217. 1997.

Hambley JW, Johnston GAR y Shaw J. Alterations in a hypothalamic GABA system in the spontaneously hypertensive rat. *Neurochem Int* 6, pp: 813-822, 1984.

Hanley MR, Jackson TR, Vallejo M, Patterson SI, Thastrup O, Lightman S, Rogers J, Henderson G y Pini A. Neural function: metabolism and actions of inositol metabolites in mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 320(1199): 381-98. 1988.

Haxhiu MA, Erokwu BO, Cherniack NS. The brainstem network involved in coordination of inspiratory activity and cholinergic outflow to the airways. *J Auton Nerv Syst* 61(2): 155-61. 1996.

Haxhiu MA, Yamamoto BK, Dreshaj IA y Ferguson DG. Activation of the midbrain periaqueductal gray induces airway smooth muscle relaxation. *J Appl Physiol* 93: 440–449. 2002.

Hayashi F y Sinclair JD. Respiratory patterns in anesthetized rats before and after anemic decerebration. *Respir Physiol* 84: 61-76. 1991.

Hayashi Y, Sekiyama N, Nakanishi, Jane DE, Sunter DC, Birse EF, Udvarhelyi PM y Watkins JC. Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *J. Neurosci.* 14: 3370-3377. 1994.

Hayward LF. Midbrain modulation of the cardiac baroreflex involves excitation of lateral parabrachial neurons in the rat. *Brain Res* 1145: 117–127. 2007.

Head GA, y Adams MA. Time course of changes in baroreceptor reflex control of heart rate in conscious SHR and WKY: contribution of the cardiac vagus and sympathetic nerves. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15: 289-292, 1988.

Heinricher MM, Tavares I, Leith JL y Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 60: 214 – 225. 2009.

Herbert H, Moga MM y Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293: 540–580. 1990.

Herbert H y Saper CB. Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *J Comp Neurol* 315: 34 –52. 1992.

Herdegen T, Kovary K, Leah J y Bravo R. Specific temporal and spatial distribution of Jun, Fos and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol* 313: 178–191. 1991.

Herlenius E y Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 190 Suppl 1: S8-21. 2004.

Herzig TC, Buchholz RA y Haywood JR. Effects of paraventricular nucleus lesions on chronic renal hypertension. *Am J Physiol* 261(3 Pt 2): H860-7. 1991.

Hilaire G. Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: possible implication for SIDS. *Auton Neurosci* 126-127: 320-31. 2006.

Hilaire G, Bou C y Monteau R. Rostral ventrolateral medulla and respiratory rhythmogenesis in mice. *Neurosci Lett* 224(1): 13-6. 1997.

Hilaire G, Bou C y Monteau R. Serotonergic modulation of central respiratory activity in the neonatal mouse: an in vitro study. *Eur J Pharmacol* 329(2-3): 115-20. 1997.

Hilaire G, Monteau R y Erchidi S. Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 Área: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res* 485: 325–332. 1989.

Hilaire G, Monteau R, Erchidi S, Morin D y Cottet-Emard JM. Noradrenergic modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine A5 Área. In: Speck DF, Dekin MS, Revelette WR, Frazier DT (eds) *Respiratory control: central and peripheral mechanisms*. University Press of Kentucky, Lexington, pp: 43–46. 1993.

Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M y Bévangut M. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol*. 143(2-3): 187-97. 2004.

Hilton SM. Inhibition of baroreceptor reflexes on hypothalamic stimulation. *J Physiol* 165: 56P-57P. 1963.

Hilton SM. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol* 100: 159–174. 1982.

Hilton SM y Joels N. Facilitation of chemoreceptor reflexes during defence reaction. J Physiol 176, pp: 20P-22P, 1964.

Hilton SM y Redfern WS. Exploration of the brain stem defence Áreas with a synaptic excitant in the rat. J Physiol 345: 134P, 1983.

Hilton SM y Redfern WS. A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. J Physiol (Lond.) 378: 213-228. 1986.

Hilton SM y Smith PR. Ventral medullary neurones excited from the hypothalamic and mid-brain defence Áreas. J Auton Nerv Sys 11: 35-42, 1984.

Holstege G. Some anatomical observations on the projections from the hypothalamus to brainstem and spinal cord: an HRP and autoradiographic tracing study in the cat. J Comp Neurol 260(1): 98-126. 1987.

Holstege G. Micturition and the soul. J Comp Neurol 493: 15–20. 2005.

Holstege G. The emotional motor system and micturition control. Neurourol Urodyn 29: 42– 48. 2010.

Holstege G, Bandler R y Saper CB. The emotional motor system. Prog Brain Res 107: 3– 6. 1996.

Horiuchi J y Dampney RA. Evidence for tonic disinhibition of RVLM sympathoexcitatory neurons from the caudal pressor Área. Auton Neurosci 99(2): 102-10. 2002.

Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA y Dampney RA. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic

nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R824–R832. 2004.

Horiuchi J, McDowall LM y Dampney RA. Differential control of cardiac and sympathetic vasomotor activity from the dorsomedial hypothalamus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33: 1265 –1268. 2006.

Horiuchi J, McDowall LM y Dampney RA. Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *J. Physiol.* 587: 5149–5162. 2009.

Horn EM y Waldrop TG. Modulation of the respiratory responses to hypoxia and hypercapnia by synaptic input onto caudal hypothalamic neurons. *Soc Neurosci Abstr* 18, 827. 1992.

Horne RS, Parslow PM y Harding R. Respiratory control and arousal in sleeping infants. *Paediatr Respir Rev* 5(3): 190-8. 2004.

Hosobuchi Y, Adams JE y Linchitz R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science* 197: 183–186. 1977.

Hsieh KC, Gvilia I, Kumar S y cols. c-Fos expression in neurons projecting from the preoptic and lateral hypothalamic Areas to the ventrolateral periaqueductal gray in relation to sleep states. *Neuroscience* 188: 55– 67. 2011.

Huang L, Guo H, Hellard DT y Katz DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is required for differentiation of pontine noradrenergic neurons and patterning of central respiratory output. *Neuroscience* 130(1): 95-105. 2005.

Huang ZG, Subramanian SH, Balnave RJ, Turman AB y Moi Chow C. Roles of periaqueductal gray and nucleus tractus solitarius in cardiorespiratory function in the rat brainstem. *Resp. Physiol.* 120: 185–195. 2000.

Huangfu D, Hwang T, Riley TA y Guyenet PG. Splanchnic nerve response to A5-Área stimulation in rats. *Am J Physiol* 263: R437–R446. 1992.

Huangfu D, Koshiya N y Guyenet PG. A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. *Am J Physiol* 261: R393–R402. 1991.

Humphrey PW, Joels N y McAllen RM. Modification of the reflex response to stimulation of carotid sinus baroreceptors during and following stimulation of the hypothalamic defence Área in the cat. *J Physiol (Lond)* 216: 461–482. 1971.

Hunt SP, Pini A y Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328: 632–634. 1987.

Hwang KR, Chan SHH y Chan JYH. Noradrenergic neurotransmission at PVN in locus coeruleus-induced baroreflex suppression in rats. *Am J. Physiol.* 274 (Heart Circ. Physiol. 43), pp: H1284-H1292. 1998.

Iigaya K, Horiuchi J, McDowall LM y Dampney RAL. Topographical specificity of regulation of respiratory and renal sympathetic activity by the midbrain dorsolateral periaqueductal gray. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299: R853–R861. 2010.

Iigaya K, Horiuchi J, McDowall LM, Lam ACB, Sediqi Y, Polson JW, Carrive P y Dampney RAL. Blockade of orexin receptors with Almorexant reduces cardiorespiratory responses evoked from the hypothalamus but not

baro- or chemoreceptor reflex responses. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 303: R599–R610. 2012.

Illing RB y Graybiel AM. Complementary and non-matching afferent compartments in the cat's superior colliculus: innervation of the acetylcholinesterase-poor domain of the intermediate gray layer. Neuroscience 18: 373–394. 1986.

Ishikawa M, Shimada S y Tanaka C. Histochemical mapping of catecholamine neurons and fiber pathways in the pontine tegmentum of the dog. Brain Res 86(1): 1-16. 1975.

Itoi K, Jost N, Badoer E, Tschöpe C, Culman J y Unger T. Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. Brain Res 558: 123-126. 1991.

Jensen TS y Yaksh TL. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. Brain Res 321: 287–297. 1984.

Jensen TS y Yaksh TL. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. Brain Res 363: 99–113. 1986.

Jin CB y Rockhold RW. Effects of paraventricular hypothalamic microinfusions of kainic acid on cardiovascular and renal excretory function in conscious rats. J Pharmacol Exp Ther 251(3): 969-75. 1989.

Jodkowski JS, Coles SK y Dick TE. A “pneumotaxic centre” in rats. Neurosci Lett 172: 67–72. 1994.

Jodkowski JS, Coles SK y Dick TE. Prolongation in expiration evoked from ventrolateral pons of adult rats. *J Appl Physiol* 82: 377–381. 1997.

Jordan D. Autonomic changes in affective behaviour. In central regulation of autonomic function, ed. Loewy AD y Spyer KM 349-366. 1990.

Jordan D, Mifflin SW y Spyer KM. Hypothalamic inhibition of neurones in the tractus solitarius of the rat is GABA mediated. *J. Physiol* 399: 389-404. 1988.

Julu PO, Kerr AM, Apartopoulos F, Al-Rawas S, Engerström IW, Engerström L, Jamal GA y Hansen S. Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch Dis Child* 85(1): 29-37. 2001.

Jurgens U. The neural control of vocalization in mammals: a review. *J Voice* 23: 1–10. 2009.

Juskevich J C, Robinson DS y Whitehorn D. Effect of hypothalamic stimulation in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Eur J Pharmacol* 51: 429–439. 1978.

Kabat H, Magoun HW y Ranson SW. Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain: The resultant alterations in blood pressure. *Arch Neurol Psychol* 34: 931–955. 1935.

Kabir MM, Beig MI, Baumert M, Trombini M, Mastorci F, Sgoifo A, Walker FR, Day TA y Nalivaiko E. Respiratory pattern in awake rats: effects of motor activity and of alerting stimuli. *Physiol. Behav.* 101: 22–31. 2010.

Kanbar R, Depuy DS, West GH, Stornetta RL y Guyenet PG. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. *J Physiol* 589.4 pp 903–917. 2011.

Kase M, Nagata R y Kato M. Saccade-related activity of periaqueductal gray matter of the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27: 1165–1169. 1986.

Katz DM. Neuronal growth factors and development of respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* 135(2-3): 155-65. Review. 2003.

Katz DM. Regulation of respiratory neuron development by neurotrophic and transcriptional signaling mechanisms. *Respir Physiol Neurobiol* 149(1-3): 99-109. Review. 2005.

Kavia RB, Dasgupta R y Fowler CJ. Functional imaging and the central control of the bladder. *J Comp Neurol* 493: 27–32. 2005.

Keay KA y Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25: 669–678. 2001.

Keay KA y Bandler R. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. *Exp Physiol* 87: 275–279. 2002.

Keay KA, Redgrave P y Dean P. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res. Bull.* 20: 13–26. 1988.

Kemp JA y Leeson PD. The glycine site of the NMDA receptor- five years on. *Trends Pharmacol Sc.* 14: 20-25, 1993.

Kiely JM y Gordon FJ. Role of rostral ventrolateral medulla in centrally mediated pressor responses. *Am. J. Physiol.* 267 (4 Pt 2), pp: H 1549-56, 1994.

Kijima K, Sasaki A, Niki T, Umetsu K, Osawa M, Matoba R y Hayasaka K. Sudden infant death syndrome is not associated with the mutation of PHOX2B gene, a major causative gene of congenital central hypoventilation syndrome. *Tohoku J Exp Med* 203(1): 65-8. 2004.

Klein S, Nicolas LB, Lopez-Lopez C, Jacobson LH, McArthur SG, Grundschober C, y Prinssen EP. Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology* 211: 197–208. 2010.

Klop EM, Mouton LJ, Ehling T y Holstege G. Two parts of the nucleus prepositus hypoglossi project to two different subdivisions of the dorsolateral periaqueductal gray in cat. *J. Comp. Neurol.* 492: 303–322. 2005.

Klop EM, Mouton LJ y Holstege G. Periparabigeminal and adjoining mesencephalic tegmental field projections to the dorsolateral periaqueductal grey in cat — a possible role for oculomotor input in the defensive system. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2145–2157. 2006.

Korte SM, Jaarsma D, Luiten PG y Bohus B. Mesencephalic cuneiform nucleus and its ascending and descending projections serve stress-related cardiovascular responses in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 41: 157–176. 1992.

Koshiya N y Guyenet PG. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol* 267: R508-518. 1994.

Koshiya N y Guyenet PG. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol* 267: R519–R526. 1994.

Koshiya N y Smith JC. Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400(6742): 360-3. 1999.

Krout KE, Jansen AS y Loewy AD. Periaqueductal gray matter projection to the parabrachial nucleus in rat. *J. Comp. Neurol.* 401: 437–454. 1998.

Krout KE y Loewy AD. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 424: 111–141. 2000.

Krukoff TL. Expression of *c-fos* in studies of central autonomic and sensory systems. *Mol Neurobiol* 7: 247–263. 1993.

Krukoff TL y Weigel MA. Metabolic alterations in discrete regions of the rat brain during development of spontaneous hypertension. *Brain Res* 499: 1– 6. 1989.

Kuner T y Schopfer R. Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg^{2+} block in NMDA receptor channels. *J Neurosci* 16: 3549-3558. 1996.

Kwiat GC y Basbaum AI. Organization of tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive brainstem neurons with axon collaterals to the periaqueductal gray and the spinal cord in the rat. *Brain Res* 528(1): 83-94. 1990.

Lackner KJ. Mapping of monoamine neurones and fibres in the cat lower brainstem and spinal cord. *Anat Embryol (Berl)* 161(2): 169-95. 1980.

Lam W, Gundlach AL y Verberne AJ. Neuronal activation in the forebrain following electrical stimulation of the cuneiform nucleus in the rat: hypothalamic expression of c-fos and NGFI-A messenger RNA. *Neuroscience* 78: 1069–1085. 1997.

Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de Pommery J y Menetrey D. Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-fos and other immediate early gene proteins. *Neuroscience* 58: 287–298. 1994.

Lara JP, Dawid-Milner MS, Lopez MV, Montes C, Spyer KM y Gonzalez-Baron S. Laryngeal effects of stimulation of rostral and ventral pons in the anaesthetized rat. *Brain Res* 934(2): 97-106. 2002.

Lee A, Wissekerke AE, Rosin DL y Lynch KR. Localization of alpha2C-adrenergic receptor immunoreactivity in catecholaminergic neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 84(4): 1085-96. 1998.

Levine JD, Gordon NC, Jones RT y Fields HL. The narcotic antagonist naloxone enhances clinical pain. *Nature* 272: 826–827. 1978.

Li A y Nattie E. Prolonged stimulation of respiration by brain stem metabotropic glutamate receptors. *J Appl Physiol* 79(5): 1650-6. 1995.

Li P y Lovick TA. Excitatory projections from hypothalamic and midbrain defense regions to nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. *Exp Neurol* 89: 543-553, 1985.

Li YW y Dampney RAL. Expression of c-fos protein in the medulla oblongata of conscious rabbits in response to baroreceptor activation. *Neurosci Lett* 144: 70–74. 1992.

Li YW y Dampney RAL. Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience* 61: 613–634. 1994.

Lipski J, Bellingham MC, West MJ y Pilowsky P. Limitations of the technique of pressure microinjection of excitatory amino acids for evoking responses from localized regions of the CNS. *J. Neurosci. Meth.* 26, pp: 169-179, 1988.

Liu Z, Sakakibara R, Nakazawa K Uchiyama T, Yamamoto T, Ito T y Hattori T. Micturitionrelated neuronal firing in the periaqueductal gray Área in cats. *Neuroscience* 126: 1075–1082. 2004.

Loewy AD, Gregorie EM, McKellar S y Baker RP. Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. *Brain Res* 178: 196–200. 1979.

Loewy AD, Marson L, Parkinson D, Perry MA y Sawyer WB. Descending noradrenergic pathways involved in the A5 depressor response. *Brain Res* 386: 313–324. 1986.

López-González MV, Díaz-Casares A, Peinado-Aragonés CA, Lara JP, Barbancho MA y Dawid-Milner MS. Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence Área in anaesthetized rats. *Exp physiol.* Vol 98, 1279-1294. 2013.

Lorente de no R. Quaternary ammonium ions and sodium ions in nerve physiology. *Bull Johns Hopkins Hosp* 83(6): 497-531. 1948.

Lovick TA. Projections from the diencephalons and mesencephalon to nucleus paragigantocellularis lateralis in the cat. *Neurosci* 14: 853-861. 1985.

Lovick TA. Central nervous system integration of pain control and autonomic functions. *News Physiol Sci* 6: 82-86. 1991.

Lu J, Jhou TC y Saper CB. Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci* 26: 193–202. 2006.

Lu JW, Fenik VB, Branconi JL, Mann GL, Rukhadze I y Kubin L. Disinhibition of perifornical hypothalamic neurones activates noradrenergic neurones and blocks pontine carbachol-induced REM sleep-like episodes in rats. *J Physiol* 582(Pt 2): 553-67. 2007.

Luiten PG, ter Horst GJ, Karst H y Steffens AB. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res* 329(1-2): 374-8. 1985.

Lumb BM. Hypothalamic and midbrain circuitry that distinguishes between escapable and inescapable pain. *News Physiol Sci* 19: 22–26. 2004.

Lumb BM y Lovick TA. The rostral hypothalamus: an Área for the integration of autonomic and sensory responsiveness. *J. Neurophysiol.* 70: 1570–1577. 1993.

Lumsden T. The regulation of respiration: Part I. *J Physiol* 58(1): 81-91. 1923.

Mancia G y Zancchetti A. Hypothalamic control of autonomic functions. In: *Handbook of the Hypothalamus, Vol 3, Part B, Behavioral Studies of the Hypothalamus*, ed Morgane PJ and Panksepp J, Dekker, New York, 147-201. 1981.

Mantyh PW. Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey: I: ascending efferent projections. *J Neurophysiol* 49: 567–581. 1983.

Mantyh PW. Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey: II: descending efferent projections. *J Neurophysiol* 49: 582–594. 1983.

Maren S. Neuroscience: the threatened brain. *Science* 317: 1043–1044. 2007.

Markgraf CG, Winters RW, Liskowsky DR, McCabe PM, Green EJ y Schneiderman N. Hypothalamic, midbrain and bulbar Áreas involved in the defense reaction in rabbits. *Physiol Behav* 49: 493-500. 1991.

Markham CM, Blanchard DC, Canteras NS, Cuyno CD y Blanchard RJ. Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premammillary nucleus. *Neurosci. Lett.* 372: 22–26. 2004.

Marques-Lopes J, Pinho D, Albino-Teixeira A y Tavares I. The hyperalgesic effects induced by the injection of angiotensin II into the caudal ventrolateral medulla are mediated by the pontine A5 noradrenergic cell group. *Brain Res* 1325: 41-52. 2010.

Martin DS y Haywood JR. Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculline in conscious rats. *Am J Physiol* 265: H1727– 33. 1993.

Martin JR, Beinfeld M y Westfall TC. Blood pressure increases after injection of neuropeptide Y into posterior hypothalamic nucleus. *Am J Physiol* 254: H879-H888. 1988.

Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G y Sun YE. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302(5646): 890-3. 2003.

McCulloch PF, Faber KM y Panneton WM. Electrical stimulation of the anterior ethmoidal nerve produces the diving response. *Brain Res* 830(1): 24-31. 1999.

McCulloch PF y Panneton WM. Fos immunohistochemical determination of brainstem neuronal activation in the muskrat after nasal stimulation. *Neuroscience* 78(3): 913-25. 1997.

McCulloch PF, Panneton WM y Guyenet PG. The rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoactivation produced by chemical stimulation of the rat nasal mucosa. *J Physiol* 516 (Pt 2): 471-84. 1999.

McDowall LM, Horiuchi J y Dampney RAL. Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: R1728–R1735. 2007.

McDowall LM, Horiuchi J, Killinger S y Dampney RAL. Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical Área. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(4): R1020-6. 2006.

McDowall LM, Horiuchi J, Killinger S y Dampney RAL. Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical Área. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R1027–R1034. 2006.

McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R y Hunt GE. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J. Neurosci.* 24: 4134–4144. 2004.

McKay LC, Janczewski WA y Feldman JL. Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzing complex neurons. *Nat Neurosci* 8(9): 1142-4. 2005.

McKenna JE y Melzack R. Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test. *Exp Neurol.* Nov; 172(1): 92-9. 2001.

McLean KJ, Jarrott B y Lawrence AJ. Hypotension activates neuropeptide Y-containing neurons in the rat medulla oblongata. *Neuroscience* 92: 1377–1387. 1999.

McNaughton N y Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 285–305. 2004.

Mereu G, Costa E, Armstrong DM y Vicini S. Glutamate receptor subtypes mediate excitatory synaptic currents of dopamine neurons in midbrain slices. *J Neurosci* 11: 1359-1366, 1991.

Mifflin SW, Spyer KM y Withington-Wray DJ. Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: modulation by the hypothalamus. *J Physiol* 399, pp: 369-387, 1988b.

Miguel TT y Nunes-de-Souza RL. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res* 1076: 42–48. 2006.

Miki K y Yoshimoto M. Role of differential changes in sympathetic nerve activity in the preparatory adjustments of cardiovascular functions during freezing behavior in rats. *Exp. Physiol.* 95: 56–60. 2010.

Miller BD y Felder RB. Excitatory amino acid receptors intrinsic to synaptic transmission in nucleus tractus solitarii. *Brain Res.* 456: 333-343, 1988.

Minami N, Imai Y, Munakata M, Sasaki S, Sekino H, Abe K y Yoshinaga K. Age-related changes in blood pressure, Heart rate and baroreflex sensitivity in SHR. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15: 85-87, 1989.

Minson JB, Llewellyn-Smith IJ, Chalmers JP, Pilowsky PM y Arnold LF. c-fos identifies GABA-synthesizing barosensitive neurons in caudal ventrolateral medulla. *NeuroReport* 8: 3015–3021. 1997.

Mitchell IJ, Dean P y Redgrave P. The projection from superior colliculus to cuneiform Area in the rat. II. Defence-like responses to stimulation with glutamate in cuneiform nucleus and surrounding structures. *Exp. Brain Res.* 72: 626–639. 1988.

Mitchell VA, Kawahara H y Vaughan CW. Neurotensin inhibition of GABAergic transmission via mGluR-induced endocannabinoid signalling in rat periaqueductal grey. *J Physiol* 587: 2511–2520. 2009.

Miura M, Takayama K y Okada J. Neuronal expression of Fos protein in the rat brain after baroreceptor stimulation. *J Auton Nerv Syst* 50: 31–43. 1994.

Mobbs D, Marchant JL, Hassabis D, Seymour B, Tan G, Gray M, Petrovic P, Dolan RJ y Frith CD. From threat to fear: the neural organization of defensive fear systems in humans. *J Neurosci* 29: 12236 – 12243. 2009.

Mobbs D, Petrovic P, Marchant, JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ y Frith CD. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal–periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317: 1079–1083. 2007.

Monteau R, Gauthier P, Rega P y Hilaire G. Effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK-801 on breathing pattern in rats. *Neurosci Lett* 109: 134-139. 1990.

Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL y Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237: 192–197. 1987.

Morgan JI y Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12: 459–462. 1989.

Morgan JI y Curran T. Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun *Ann Rev Neurosci* 14: 421–451. 1991.

Moriguchi A, Mikami H, Otsuka A, Katahira K, Kohara K y Ogihara T. Amino acids in the medulla oblongata contribute to baroreflex modulation by angiotensin II. *Brain Res. Bull.* 36, pp: 85-89. 1995.

Motekaitis AM, Solomon IC y Kaufman MP. Blockade of glutamate receptors in CVLM and NTS attenuates airway dilation evoked from parabrachial region. *J Appl Physiol* 81 (1): 400-7. 1996.

Motta SC, Goto M, Gouveia FV, Baldo MV, Canteras NS y Swanson LW. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 4870–4875. 2009.

Nashold BS Jr, Wilson WP y Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14 –24. 1969.

Natarajan M y Morrison SF. Sympathoexcitatory CVLM neurons mediate responses to caudal pressor Área stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(2): R364-74. 2000.

Nathan MA y Reis DJ. Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in the rat. *Circ Res* 37(2): 226-35. 1975.

Nattie E y Li A. Central chemoreception 2005: a brief review. *Auton Neurosci* 126-127: 332-8. Review. 2006.

Nattie E y Li A. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. *J Appl Physiol* 101(6): 1596-606. 2006.

Neil JJ y Loewy AD. Decreases in blood pressure in response to L-glutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. *Brain Res* 241: 271–278, 1982.

Netzer F, Mandjee N, Verberne AJ, Bernard JF, Hamon M, Laguzzi R, Sévoz-Couche C. Inhibition of the bradycardic component of the von Bezold-Jarisch reflex and carotid chemoreceptor reflex by periaqueductal gray stimulation: involvement of medullary receptors. *Eur J Neurosci.* 29(10):2017-28. 2009

Newman DB, Hileary SK y Ginsberg CY. Nuclear terminations of corticonuclear fiber systems in rats. *Brain Behav. Evol.* 34: 223–264. 1989.

Nielsen AM, Bisgard GE y Mitchell GS. Phrenic nerve responses to hypoxia and CO₂ in dogs. *Respir Physiol* 65: 267-283. 1986.

Nosaka S, Murata K, Inui K y Murase S. Arterial baroreflex inhibition by midbrain periaqueductal grey in anaesthetised rats. *Pflügers Arch.* 424, pp: 266-275. 1993.

Núñez-Abades PA, Morillo AM y Pásaro R. Brainstem connections of the rat ventral respiratory subgroups: afferent projections. *J Auton Nerv Syst* 42: 99-118.1993.

Obonai T, Yasuhara M, Nakamura T y Takashima S. Catecholamine neurons alteration in the brainstem of sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics* 101(2): 285-8. 1998.

Ohta H, Nakamura S, Watanabe S y Ueki S. Effect of L-glutamate, injected into the posterior hypothalamus, on blood pressure and heart rate in unanesthetized and unrestrained rats. *Neuropharmacology* 24(5): 445-51. 1985.

Okamoto K. Spontaneous hypertension in rats. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 7: 227-270. 1969.

Onstott D, Mayer B y Beitz AJ. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res.* 610: 317–324. 1993.

Owen SL, Green AL, Nandi DD, Bittar RG, Wang S y Aziz TZ. Deep brain stimulation for neuropathic pain. *Acta Neurochir Suppl* 97: 111–116. 2007.

Ozawa Y, Obonai T, Itoh M, Aoki Y, Funayama M y Takashima S. Catecholaminergic neurons in the diencephalon and basal ganglia of SIDS. *Pediatr Neurol* 21(1): 471-5. 1999.

Ozawa Y, Takashima S y Tada H. Alpha2-adrenergic receptor subtype alterations in the brainstem in the sudden infant death syndrome. *Early Hum Dev* 75 Suppl: S129-38. 2003.

Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Berrino L, Rossi F y Maione S. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain* 6: 66. 2010.

Panneton WM, McCulloch PF y Sun W. Trigemino-autonomic connections in the muskrat: the neural substrate for the diving response. *Brain Res* 874(1): 48-65. 2000.

Parry DM, Macmillan FM, Koutsikou S, McMullan S y Lumb BM. Separation of A- versus C-nociceptive inputs into spinal-brainstem circuits. *Neuroscience* 152: 1076–1085. 2008.

Parvizi J, Van Hoesen GW y Damasio A. Selective pathological changes of the periaqueductal gray matter in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48: 344 – 353. 2000.

Patel KP y Schmid PG. Role of paraventricular nucleus (PVH) in baroreflex-mediated changes in lumbar sympathetic nerve activity and heart rate. *J Auton Nerv Syst* 22(3): 211-9. 1988.

Patel NK, Javed S, Khan S, Papouchado M, Malizia AL, Pickering AE y Paton JF. Deep brain stimulation relieves refractory hypertension. *Neurology* 76: 405–407. 2011.

Paton JFR, La Noce A, Sykes RM, Sebastiani L, Bagnoli P, Ghelarducci B y Bradley DJ. Efferent connections of lobule IX of the posterior cerebellar cortex in the rabbit-some functional considerations. *J. Comp. Auton. Nerv. Syst.* 36, pp: 209-223, 1991.

Paxinos G y Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press. 1998.

Peano CA, Shonis CA, Dillon GH y Waldrop TG. Hypothalamic GABAergic mechanism involved in the respiratory response to hypercapnia. *Brain Res Bull* 28: 107-113, 1992.

Pereira EA, Green AL, Nandi D y Aziz TZ. Deep brain stimulation: indications and evidence. *Expert Rev Med Devices* 4: 591– 603. 2007.

Petralia RS, Rubio ME, Wang YX y Wenthold RJ. Regional and synaptic expression of ionotropic glutamate receptors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 18: 45-182, 2000.

Petrov T, Harris KH, MacTavish D, Krukoff TL y Jhamandas JH. Hypotension induces Fos immunoreactivity in NADPHdiaphorase positive neurons in the paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei of the rat. *Neuropharmacology* 34: 509–514. 1995.

Pilowsky PM y Goodchild AK. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *J Hypert* 20: 1675–1688. 2002.

Pinto M, Lima D, Castro-Lopes J y Tavares I. Noxious-evoked c-fos expression in brainstem neurons immunoreactive for GABAB, mu-opioid and NK-1 receptors. *Eur J Neurosci* 17(7): 1393-402. 2003.

Ploner M, Lee MC, Wiech K, Bingel U y Tracey I. Prestimulus functional connectivity determines pain perception in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 355–360. 2010.

Proudfit HK. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. In HL Fields and JM Besson (Eds.), *Progress in Brain Research*, Vol. 72 Elsevier, Amsterdam, 357-370. 1988.

Puma C y Bizot JC. Intraseptal infusions of a low dose of AP5, a NMDA receptor antagonist, improves memory in an object recognition task in rats. *Neurosci Lett*. Jun 5; 248(3):183-6. 1998.

Ranson SW y Magoun HW. The hypothalamus. *Ergebn. Physiol.* 41, pp: 56-163, 1939.

Redgrave P, Dean P, Mitchell IJ, Odekunle A y Clark A. The projection from superior colliculus to cuneiform Área in the rat I. Anatomical studies. *Exp. Brain Res.* 72: 611–625. 1988.

Reiman EM, Raichle ME y Robins E. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch. Gen. Psychiatry* 46: 493–500. 1989.

Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164: 444–445. 1969.

Rhoades RW, Mooney RD, Rohrer WH, Nikolettseas MM y Fish SE. Organization of the projection from the superficial to the deep layers of the hamster's superior colliculus as demonstrated by the anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 283: 54–70. 1989.

Ribas-Salgueiro JL, Pásaro-Dionisio MR y Ribas-Serna J. Central chemoreceptors and sudden infant death syndrome. *Rev Neurol* 39(6): 555–64. Review. 2004.

Ricardo JA y Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153(1): 1–26. 1978.

Risold PY, Canteras NS y Swanson LW. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348: 1–40. 1994.

Rizvi TA, Ennis M, Behbehani M y Shipley MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol.* 303: 121–131. 1991.

Rizvi TA, Ennis M y Shipley MT. Reciprocal connections between the medial preoptic Área and the midbrain periaqueductal gray in rat: a WGA-HRP and PHA-L study. *J. Comp. Neurol.* 315: 1–15. 1992.

Rocha MJ y Herbert H. Effects of anesthetics on Fos protein expression in autonomic brain nuclei related to cardiovascular regulation. *Neuropharmacology* 36: 1779–1781. 1997.

Rockhold RW, Acuff CG y Clower BR. Excitotoxic lesions of the paraventricular hypothalamus: metabolic and cardiac effects. *Neuropharmacology* 29(7): 663-73. 1990.

Rosen A. Augmented cardiac contraction, heart rate acceleration and skeletal muscle vasodilatation produced by hypothalamic stimulation in the cat. *Acta Physiol Scand* 52, 291–308. 1961.

Rosin DL, Chang DA y Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* 499(1): 64-89. 2006.

Roux JC, Mamet J, Perrin D, Peyronnet J, Royer C, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Dalmaz Y. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. *J Neural Transm* 110(1): 51-65. 2003.

Roux JC, Peyronnet J, Pascual O, Dalmaz Y, Pequignot JM. Ventilatory and central neurochemical reorganisation of O₂ chemoreflex after carotid sinus nerve transection in rat. *J Physiol* 522 Pt 3: 493-501. 2000.

Rowland NE. Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: insights from use of immediate early gene mapping. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 49–63. 1998.

Samuels BC, Zaretsky DV y DiMicco JA. Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus is mediated through medullary raphe. *J Physiol* 538: 941–946. 2002.

Samuels BC, Zaretsky DV y DiMicco JA. Dorsomedial hypothalamic sites where disinhibition evokes tachycardia correlate with location of raphe-projecting neurons in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R472–R478. 2004.

Saper CB. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu Rev Neurosci* 25: 433–469. 2002.

Saper CB, Loewy AD, Swanson LW y Cowan WM. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res.* 117: 305-312. 1976a.

Saper CB, Swanson LW y Cowan WM. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169: 409-442. 1976b.

Saper CB, Swanson LW y Cowan WM. The efferent connections of the anterior hypothalamic Área of the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol* 182: 575-599. 1978.

Sasaki A, Kanai M, Kijima K, Akaba K, Hashimoto M, Hasegawa H, Otaki S, Koizumi T, Kusuda S, Ogawa Y, Tuchiya K, Yamamoto W y Nakamura T, Hayasaka K. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet* 114(1): 22-6. 2003.

Sawchenko PE y Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res Rev.* 4, 275–326. 1982.

Schadt JC y Hasser EM. Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R814–R821. 1998.

Schlenker EH y Prestbo A. Elimination of the post-hypoxic frequency decline in conscious rats lesioned in pontine A5 region. *Respir Physiol Neurobiol* 138(2-3): 179-91. 2003.

Schramm LP y Bignall KE. Central neural pathways mediating active sympathetic muscle vasodilation in cats. *Am J Physiol* 221: 754-767. 1971.

Schwanzel-Fukuda M, Morrell JI y Pfaff DW. Localization of forebrain neurons which project directly to the medulla and spinal cord of the rat by retrograde tracing with wheat germ agglutinin. *J Comp Neurol* 226(1): 1-20. 1984.

Seeburg PH. The TIPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 14: 297-303. 1993.

Segura T, Martin DS, Sheridan PJ y Haywood JR. Measurement of the distribution of [³H] bicuculline microinjected into the rat hypothalamus. *J Neurosci Meth* 41: 175-186. 1992.

Semenenko FM y Lumb BM. Projections of anterior hypothalamic neurones to the dorsal and ventral periaqueductal grey in the rat. *Brain Res.* 582: 237–245. 1992.

Sévoz-Couche C, Comet MA, Hamon M y Laguzzi R. Role of nucleus tractus solitarius 5-HT₃ receptors in the defence reaction-induced inhibition of the aortic baroreflex in rats. *J Neurophysiol* 90: 2521–2530, 2003.

Sheng M y Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477–485. 1990.

Shigemoto R y Mizuno N. Metabotropic glutamate receptors immunocytochemical and in situ hybridization analyses. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 18: 63-98, 2000.

Shimada SG y Stitt JT. An analisis of the purinergic components of active muscle vasodilation obtained by electrical stimulation of the hypothalamus in rabbits. *Br J Pharmacol* 83: 577-589, 1984.

Shirasawa S, Arata A, Onimaru H, Roth KA, Brown GA, Horning S, Arata S, Okumura K, Sasazuki T y Korsmeyer SJ. Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. *Nat Genet* 24(3): 287-90. 2000.

Shonis CA, Peano CA, Dillon GH y Waldrop TG. Cardiovascular responses to blockade of GABA synthesis in the hypothalamus of the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res Bull* 31: 493–499; 1993.

Shonis CA y Waldrop TG. Augmented neuronal activity in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull* 30: 45–52; 1993.

Siegfried B y de Souza RL. NMDA receptor blockade in the periaqueductal grey prevents stress-induced analgesia in attackedmice. *Eur J Pharmacol* 168: 239 –242. 1989.

Sillery E, Bittar RG, Robson MD Behrens TE, Stein J, Aziz TZ y Johansen-Berg H. Connectivity of the human periventricular-periaqueductal gray region. *J Neurosurg* 103: 1030 –1034. 2005.

Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE y Spyer KM. Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *J Physiol* 487: 751-760. 1995.

Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, y Spyer KM. The pattern of excitatory inputs to the nucleus tractus solitarii evoked on stimulation in the hypothalamic defence Área in the cat. *J Physiol* 487.3: 727-737. 1995.

Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS y Spyer KM. Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat; role of the nucleus tractus solitarii. *J Physiol* 483.3: 751-760, 1995.

Simpson DA, Headley PM y Lumb BM. Selective inhibition from the anterior hypothalamus of C- versus A-fibre mediated spinal nociception. *Pain* 136: 305–312. 2008.

Sinha S, Papp LA y Gorman JM. How study of respiratory physiology aided our understanding of abnormal brain function in panic disorder. *J. Affect. Disord.* 61: 191–200. 2000.

Smith OA, Astley AC, De Vito JL, Stein JM y Walsh KE. Functional analysis of hypothalamic control of the cardiovascular responses accompanying emotional behaviour. *Fed Proc* 39: 2487-2494, 1980.

Sofroniew MV y Schrell U. Hypothalamic neurons projecting to the rat caudal medulla oblongata, examined by immunoperoxidase staining of retrogradely transported horseradish peroxidase. *Neurosci Lett* 19(3): 257-63. 1980.

Soltis RP y DiMicco JA. Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 261: R427–R433, 1991a.

Spencer SE, Sawyer WB y Loewy AD. L-Glutamate mapping of cardioresponsive Areas in the rat posterior hypothalamus. *Brain Res* 511: 149-157, 1990.

Spyer KM. The central nervous organisation of reflex circulatory control. In central regulation of autonomic functions, ed. Loewy AD y Spyer KM: 168-188, Oxford University Press, New York, 1990.

St. John WM. Respiratory tidal volume responses of cats with chronic pneumotoxic center lesions. *Respiration Physiol* 16: 92-108, 1972.

Stein BE y Gaither NS. Sensory representation in reptilian optic tectum: some comparisons with mammals. *J. Comp. Neurol.* 202: 69–87. 1981.

Stella G. The dependence of the activity of the "apneustic centre" on the carbon dioxide of the arterial blood. *J Physiol* 93(3): 263-75. 1938.

Stotz-Potter EH, Morin SM y DiMicco A. Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Res* 742: 219–224. 1996a.

Stotz-Potter EH, Willis LR y DiMicco A. Muscimol acts in dorsomedial and not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci* 16: 1173–1179. 1996b.

Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB y Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res* 491: 156–162. 1989.

Subramanian HH, Balnave RJ y Holstege G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J. Neurosci.* 28: 12274–12283. 2008.

Subramanian HH, Balnave RJ y Holstege G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28: 12274 –12283. 2008.

Sun MK y Guyenet PG. Hypothalamic glutamatergic input to medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am J Physiol* 251: R798-R810, 1986.

Sun W y Panneton WM. The caudal pressor Área of the rat: its precise location and projections to the ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(3): R768-78. 2002.

Sun W y Panneton WM. Defining projections from the caudal pressor Área of the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 482(3): 273-93. 2005.

Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.* 886: 113–164. 2000.

Takeda K, Nakata T, Takesako T, Itoh H, Hirata M, Kawasaki S, Hayashi J, Oguro M, Sasaki S y Nakagawa M. Sympathetic inhibition and attenuation of spontaneous hypertension by PVN lesions in rats. *Brain Res* 543(2): 296-300. 1991.

Tan E y Dampney RAL. Cardiovascular effects of stimulation of neurones within the “defence Área” of the hypothalamus and midbrain of rabbits. *Clin Exp Pharm Physiol* 10: 299-303, 1983.

Tanaka M y McAllen RM. Functional topography of the dorsomedial hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: R477–R486. 2008.

Tassorelli C y Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* 682: 167–181. 1995.

Tavares I, Lima D y Coimbra A. The ventrolateral medulla of the rat is connected with the spinal cord dorsal horn by an indirect descending pathway relayed in the A5 noradrenergic cell group. *J Comp Neurol* 374: 84–95. 1996.

Tavares I, Lima D y Coimbra A. The pontine A5 noradrenergic cells which project to the spinal cord dorsal horn are reciprocally connected with the caudal ventrolateral medulla in the rat. *Eur J Neurosci* 9: 2452–2461, 1997.

Tavares I y Lima D. From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. *J Anat* 211: 261–268. 2007.

Taxini CL, Takakura AC, Gargaglioni LH y Moreira TS. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience* 199: 177–186. 2011.

Tenney SM y Ou LC. Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO₂. *Respir Physiol* 29: 81-92, 1977.

Thomas MR y Calaresu FR. Responses of single units in the medial hypothalamus to electrical stimulation of the carotid sinus nerve in the cat. *Brain Res* 44: 49-62, 1972.

Thomas MR y Calaresu FR. Hypothalamic inhibition of chemoreceptor-induced bradycardia in the cat. *Am J Physiol* 225: 201-208, 1973.

Thompson RH, Canteras NS y Swanson LW. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 376: 143–173. 1996.

Thompson RH y Swanson LW. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res. Rev.* 27: 89–118. 1998.

Toth ZE, Gallatz K, Fodor M y Palkovits M. Decussations of the descending paraventricular pathways to the brainstem and spinal cord autonomic centers. *J Comp Neurol* 414: 255–266. 1999.

Tracey I, Ploghaus A, Gati JS y col. Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. *J Neurosci* 22: 2748 –2752. 2002.

Usunoff KG, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O y Wree A. Brain stem afferent connections of the amygdala in the rat with special references to a projection from the parabigeminal nucleus: a fluorescent retrograde tracing study. *Anat Embryol.* 211(5): 475-96. 2006.

Vagg DJ, Bandler R y Keay KA. Hypovolemic shock: critical involvement of a projection from the ventrolateral periaqueductal gray to the caudal midline medulla. *Neuroscience* 152: 1099 –1109. 2008.

Valet M, Sprenger T, Boecker H y col. Distraction modulates connectivity of the cingulo-frontal cortex and the midbrain during pain: an fMRI analysis. *Pain* 109: 399–408. 2004.

Van Bockstaele EJ, Aston-Jones G, Pieribone VA, Ennis M y Shipley MT. Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. *J. Comp. Neurol.* 309: 305–327. 1991.

Van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR y Bloom FE. The organization of projections from the cortex, amygdala and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 224: 1–24, 1984.

Verberne AJ. Cuneiform nucleus stimulation produces activation of medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 268: R752–R758. 1995.

Vianna DM y Brandao ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 557–566. 2003.

Vibert JF, Bertrand F, Denavit-Saubié M y Hugelin A. Discharge patterns of bulbo-pontine respiratory unit populations in cat. *Brain Res* 114(2): 211-25. 1976.

Viemari JC, Bévengut M, Coulon P y Hilaire G. Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. *J Neurophysiol* 91(2): 746-58. 2004.

Viemari JC, Burnet H, Bévengut M y Hilaire G. Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. *Eur J Neurosci* 17(6): 1233-44. 2003.

Viemari JC, Maussion G, Bévengut M, Burnet H, Pequignot JM, Népote V, Pachnis V, Simonneau M y Hilaire G. Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. *Eur J Neurosci.* 2005 Nov;22(10): 2403-12.

Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Peña F, Zanella S, Bévengut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB, Moncla A, Mancini J, Ramirez JM, Villard L y Hilaire G. Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci.* 2005 Dec 14; 25(50): 11521-30.

Villemure C y Bushnell MC. Mood influences supraspinal pain processing separately from attention. *J Neurosci* 29: 705–715. 2009.

Wager TD, Scott DJ y Zubieta JK. Placebo effects on human mu-opioid activity during pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11056 –11061. 2007.

Waldrop TG y Bauer RM. Modulation of sympathetic discharge by a hypothalamic GABAergic mechanism. *Neuropharmacology* 28: 263-269. 1989.

Waldrop TG. Posterior hypothalamic modulation of the respiratory response to CO₂ IN CATS. *Pflügers Arch* 418: 7-13. 1991.

Waldrop TG, Bauer RM y Iwamoto GA. Microinjection of GABA antagonist into the posterior hypothalamus elicits locomotor activity and a cardiorespiratory activation. *Brain Res* 444: 84-94. 1988.

Waldrop TG, Henderson MC, Iwamoto GA y Mitchell JH. Regional blood flow responses to stimulation of the subthalamic locomotor region. *Respir. Physiol* 64: 93-102. 1986.

Wang JQ y McGinty JF. Intrastratial injection of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG attenuates acute amphetamine-stimulated neuropeptide mRNA expression in rat striatum. *Neurosci Lett.* 25;218(1): 13-6. 1996.

Wang W, Fung M y St. John WM. Pontine regulation of ventilatory activity in the adult rat. *J Appl Physiol* 74: 2801–2811. 1993.

Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Curran ME, Silvestri JM y Marazita ML. Sudden infant death syndrome: case-control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development. *Pediatr Res* 56(3): 391-5. 2004.

Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah TR, Davis S y Forster HV. Large lesions in the pre-Bötzinger complex Área eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *J Appl Physiol* 97(5): 1629-36. 2004.

Westlund KN y Craig AD. Association of spinal lamina I projections with brainstem catecholamine neurons in the monkey. *Exp Brain Res* 110(2): 151-62. 1996.

Westlund KN, Bowker RM, Ziegler MG y Coulter JD. Origins and terminals of descending noradrenergic projections to the spinal cord of monkey, *Brain Research* 292: 1-16. 1984.

Wiberg M y Blomqvist A. The spinomesencephalic tract in the cat: its cells of origin and termination pattern as demonstrated by the intraaxonal transport method. *Brain Res.* 291: 1–18. 1984.

Wible Jr JH, DiMicco JA y Luft FC. Hypothalamic GABA and sympathetic regulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 14: 623–628. 1989.

Wible Jr JH, Luft FC y DiMicco JA. Hypothalamic GABA suppresses sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Am J Physiol* 254: R680–R687. 1988.

Wiech K y Tracey I. The influence of negative emotions on pain: behavioral effects and neural mechanisms. *Neuroimage* 47: 987–994. 2009.

Wilson LB, Andrew D y Craig AD. Activation of spinobulbar lamina I neurons by static muscle contraction. *J Neurophysiol* 87(3): 1641-5. 2002.

Winters RW, McCabe PM, Green EJ, Duan Y-F y Schneiderman N. Electrophysiological evidence for hypothalamic defence Área input to cells in the lateral tegmental field of the medulla of rabbits. *Brain Res* 558: 171-175, 1991.

Wisden W, Seeburg PH y Monyer H. AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression—an in situ hybridization atlas. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 18: 99-143, 2000.

Woodruff ML, Baisden RH, Whittington DL y

Kelly JE. Inputs to the pontine A5 noradrenergic cell group: a horseradish peroxidase study. *Exp Neurol* 94: 782–787. 1986.

Woulfe JM, Flumerfelt BA y Hryciyshyn AW. Efferent connections of the A1 noradrenergic cell group: a DBH immunohistochemical and PHA-L anterograde tracing study. *Exp Neurol* 109(3): 308-22. 1990.

Wuarin JP y Dudek FE. Excitatory amino acid antagonists inhibit synaptic responses in the guinea pig hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurophysiol* 65: 946-951, 1991.

Wyss JM y Sripanidkulchai K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* 293: 1–15. 1984.

Xing J, Li DP y Li J. Role of GABA receptors in nitric oxide inhibition of dorsolateral periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology* 54: 734–744. 2008.

Yaksh TL. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res* 160: 180–185. 1979.

Yamori Y y Okamoto K. Hypothalamic tonic regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 33: 509 –519. 1969.

Yanagihara M y Niimi K. Substance P-like immunoreactive projection to the hippocampal formation from the posterior hypothalamus in the cat. *Brain Res Bull* 22(4): 689-94. 1989.

Yardley CP y Hilton SM. The hypothalamic and brainstem Areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv System* 15: 227-244. 1986.

Yeziarski RP. Spinomesencephalic tract: projections from the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, and monkey. *J Comp Neurol* 267: 131–146. 1988.

Yoshimoto M, Nagata, K y Miki K. Differential control of renal and lumbar sympathetic nerve activity during freezing behavior in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299: R1114–R1120. 2010.

Yoshimoto Y, Sakai K, Luppi PH, Fort P, Salvert D y Jouvét M. Forebrain afferents to the cat posterior hypothalamus: a double labeling study. *Brain Res Bull* 23(1-2): 83-104. 1989.

Zaretsky DV, Zaretskaia MV y DiMicco JA. Stimulation and blockade of GABAA receptors in the raphe pallidus: effects on body temperature, heart rate and blood pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 285: R110–R116. 2003b.

Zaretsky DV, Zaretskaia MV, Samuels BC, Cluxton LK y DiMicco JA. Microinjection of muscimol into raphe pallidus suppresses tachycardia associated with air stress in rats. *J Physiol (Lond.)* 546: 243– 250. 2003a.

Zhang TX y Ciriello J. Effect of paraventricular nucleus lesions on arterial pressure and heart rate after aortic baroreceptor denervation in the rat. *Brain Res* 341(1): 101-9. 1985.

Zhang W, Hayward LF y Davenport PW. Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Auton Neurosci Basic Clin* 134: 45–54. 2007.

APÉNDICE

8. APÉNDICE

Durante la realización de esta Tesis Doctoral el doctorando ha colaborado en la publicación de 3 artículos en revistas científicas y ha contribuido con 18 comunicaciones a distintos congresos científicos.

Publicaciones en revistas

Publicaciones en revistas citadas en el ISI, Journal Citation Reports

1. M. V. López-González, A. Díaz-Casares, **C. A. Peinado-Aragonés**, J. P. Lara, M. A. Barbancho and M. S. Dawid-Milner. 2013. Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence Área in anaesthetized rats. *Experimental physiology*. Vol 98, 1279-1294. ISSN: 0958-0670. Factor de Impacto: 3,132 (JCR 2013). Cuartil: Q2. Nº de Citas: 0.
2. A. Díaz-Casares, M.V. López-González, **C. Peinado-Aragonés**, S. González-Barón, M.S. Dawid-Milner. 2012. Parabrachial complex glutamate receptors modulate the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense Área. *Autonomic Neuroscience*, Vol 169 (2), 124-134. ISSN: 1566-0702. Factor de Impacto: 1,846 (JCR 2013). Cuartil: Q4. Nº de Citas: 1.
3. Díaz-Casares A, López-González MV, **Peinado-Aragonés CA**, Lara JP, González-Barón S, Dawid-Milner MS. 2009. Role of the parabrachial complex in the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense Área stimulation in the anesthetized rat. *Brain Research*, Vol

1279, 58-70. ISSN: 0006-8993. Factor de Impacto: 2,957(JCR 2013).
Cuartil: Q3. Nº de Citas: 4.

Proceedings con factor de impacto alto

1. **Peinado-Aragonés C.A.**, López-González M.V., Dawid-Milner M.S. and González-Barón S. 2009. Interaction between the dorsolateral periaqueductal gray matter (dl-pag) and the a5 region. Role of glutamate. *Acta Physiologica*, Vol 195, Supplement 667: O01. ISSN: 1748-1708. Factor de impacto: 3,695 (JCR 2013). Cuartil: Q1.
2. M.V López-González, MS. Dawid-Milner, A. Díaz-Casares, **CA. Peinado**, JP Lara and S. González-Barón. 2003. Interactions between the hypothalamic defence Área and the A5 region: role of glutamate. *Journal of Physiology*, Vol 548P, 80-80. ISSN 0022-3751 Factor de impacto: 5,139 (JCR 2013). Cuartil: Q1.

Publicaciones en Actas de Congresos (Proceedings)

- 1- Dawid-Milner MS., López-González M.V., Díaz-Casares MA., **Peinado C.**, Lara JP., González-Barón S. 2003. Interacciones funcionales entre el Área de Defensa Hipotalámica y regiones protuberanciales cardiorrespiratorias. *Rev Neurol* 37 (12): 1189. ISSN 0210-0010. (Nacional).
- 2- **Peinado C.**, López-González M.V., Dawid-Milner M.S., Lara J.P., González-Barón S. 2003. Respuesta cardiorrespiratoria evocada por la estimulación de la sustancia gris periacueductal: función del Área A5. *Rev Neurol* 37 (12): 1189. ISSN 0210-0010. (Nacional).

- 3- López-González M. V., Dawid-Milner M. S., Rioja J., **Peinado-Aragonés C. A.**, Lara J. P. & González-Barón S. 2004. A5 neurons modulate the cardiovascular response evoked by hypothalamic defence Área stimulation in the rat. *FENS Abstr.*, vol.2, A091.3. (Internacional).

- 4- Dawid-Milner M. S, **Peinado-Aragonés C. A.**, López-González M. V., Lara J. P. & González-Barón S. 2004. Modulation of dorsolateral periaqueductal gray evoked cardiorespiratory responses by pontine structures in the rat. *FENS Abstr.*, vol.2, A022.3. (Internacional).

- 5- García-Pérez JA, López-González MV, **Peinado-Aragonés CA**, Dawid-Milner MS and González-Barón S. 2005. Effects of hypothermia on the tachycardic response to dorsolateral periaqueductal gray matter stimulation in anaesthetised rats. *J Physiol Biochem* 61 (1) 277. ISSN 1138-7548. (Internacional).

- 6- **Peinado Aragonés CA**, Dawid-Milner MS, López-González MV, Lara JP and González-Barón. 2005. A5 glutamate receptors in the cardiorespiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal gray matter in the rat: *J Physiol Biochem* 61 (1) 275. ISSN 1138-7548. (Internacional).

- 7- M.V. López-González, **C.A. Peinado Aragonés**, J.A. García-Pérez, M.S. Dawid-Milner, J.P. Lara Muñoz, S. González Barón. 2005. Efectos de la hipotermia aguda sobre la inhibición del reflejo barorreceptor evocado por estimulación del área de defensa hipotalámica (adh) en rata. *Rev Neurol* 41 (2): 42. ISSN 0210-0010. (Nacional).

- 8- **C.A. Peinado Aragonés**, M.S. Dawid-Milner, M.V. López-González, J.P. Lara Muñoz, S. González Barón. 2005. Participación de receptores glutamatérgicos del Área A5 protuberancial en la inhibición del reflejo barorreceptor evocado por estimulación de la sustancia gris periacueductal dorsolateral (dl-PAG) en rata. *Rev Neurol* 41 (2): 42. ISSN 0210-0010. (Nacional).

- 9- M.S. Dawid-Milner, M.V. López-González, **C.A. Peinado Aragonés**, J.P. Lara Muñoz, S. González Barón. 2005. Modulación catecolaminérgica de la función cardiorrespiratoria. *Rev Neurol* 41 (2): 5. ISSN 0210-0010. (Nacional).

- 10- López-González M. V., **Peinado-Aragonés C. A.**, Dawid-Milner M. S., & González-Barón S. 2006. Effects of acute hypothermia on the inhibition of the baroreceptor reflex evoked by hypothalamic defence Área stimulation in anaesthetised rats. *FENS Abstr.*, vol.3, A148.10. (Internacional).

- 11- López-González M. V., **Peinado-Aragonés C. A.**, González-Barón S. y Dawid-Milner M. S. 2006. Effects of hypothermia on the cardiovascular response evoked by hypothalamic defence Área stimulation in rats. *Clin Auton Res.* 16 (2): 174. ISSN 0959-9851. (Internacional).

- 12- L. Silva-Carvalho, M. Dawid-Milner, L. Peñuela-Ruiz, M. López-González, **C. Peinado-Aragones**, S. Laranjo, I. Rocha. 2008. Modulation of the autonomic cardiovascular response evoked by hypothalamic defence Área stimulation in the rat during hypothermia. *Proc Physiol Soc*, 10, PC36. Online ISSN: 1749-6187. (Internacional).

- 13- López-González M.V., **Peinado-Aragonés C.A.**, Díaz-Casares, A., González-Baron S. and Dawid-Milner M.S. 2010. The glutamate receptors of the $\alpha 5$ region are required for the cardiorespiratory response evoked by dorsolateral periaqueductal grey matter stimulation in the rat. *FENS Abstr.*, vol.5, 021.3. (Internacional).

- 14- Díaz-Casares A., López-González M. V., **Peinado-Aragonés C. A.**, González-Barón S. & Dawid-Milner M. S. 2010. A morphological and electrophysiological study on the interactions of the parabrachial complex and the hypothalamic defence Área in the rat. *FENS Abstr.*, vol.5, 021.9. (Internacional).

- 15- M. López-González, A. Díaz-Casares, **C.A. Peinado-Aragonés**, M.A. Barbancho-Fernández, M.S. Dawid-Milner. 2014. A5 angiotensin receptors in the cardiorespiratory responses evoked from hypothalamic defence Área in the rat. *FENS Abstr.*, vol.7, 3869. (Internacional).

- 16- A. Díaz-Casares, M.V. López-González, **C.A. Peinado-Aragonés**, M.S. Dawid-Milner. 2014. Functional interaction between medial parabrachial region and the hypothalamic defence Área: role of angiotensin II. *FENS Abstr.*, vol.7, 3866. (Internacional).

Asistencia a congresos científicos

1. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla, 2005.
2. XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Málaga, 2005.
3. XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences, Valencia, 2009.

